



HAL
open science

**Etudes de la conception et des différentes propriétés
d'un nouveau revêtement bioactif de stents
endovasculaires à base de poly(acide
[R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA)**

Elnaz Gholizadeh Ansari

► **To cite this version:**

Elnaz Gholizadeh Ansari. Etudes de la conception et des différentes propriétés d'un nouveau revêtement bioactif de stents endovasculaires à base de poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA). Génie chimique. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021. Français. NNT : 2021PA131022 . tel-03506298

HAL Id: tel-03506298

<https://theses.hal.science/tel-03506298v1>

Submitted on 2 Jan 2022

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

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



Université Sorbonne Paris Nord

Ecole doctorale ‘‘Sciences, Technologies, Santé - Galilée’’ – ED 146

Laboratory for Vascular Translational Science - INSERM U1148

Thèse de doctorat

Pour l’obtention du grade de Docteur de l’Université Sorbonne Paris Nord

Discipline : Sciences de l’ingénieur

Spécialité : Génie biologique et médical

Etudes de la conception et des différentes propriétés d’un nouveau revêtement bioactif de stents endovasculaires à base de poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA)

Présentée par

Elnaz GHOLIZADEH

Soutenue le

07/05/2021

Devant le jury composé de :

Pr Jean Coudane	IBMM, Faculté de pharmacie, Montpellier	Rapporteur
Pr Olivier Coulembier	LPCM, Université de Mons, Belgique	Rapporteur
Pr Didier Lutomski	URB2I, Université Sorbonne Paris Nord	Président du jury
Dr Véronique Bennevault	IPCM, Sorbonne Université	Examineur
Dr Rima Belibel	KymiaNova	Membre invité
Dr Hanna Hlawaty	LVTS, Université Sorbonne Paris Nord	Co-encadrant
Pr Christel Barbaud	LVTS, Université Sorbonne Paris Nord	Directeur de thèse

تقدیم به پدر و مادر عزیزم به خاطر تشویق ها و حمایت های فراوان و آرامش دهنده شان.
حضور شما هر دم باعث قوت قلب من است.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements envers les membres du jury, le **Pr Jean Coudane** (Faculté de pharmacie, Montpellier, IBMM), le **Pr Olivier Coulembier** (Université de Mons, LPCM), le **Pr Didier Lutomski** (Université Sorbonne Paris Nord, URB2I), le **Dr Véronique Bennevault** (Sorbonne Université, IPCM) et le **Dr Rima Belibel** (KymiaNova), qui ont accepté d'évaluer mes travaux de recherche dans le cadre de cette thèse.

Je remercie ma directrice de thèse, le **Pr Christel Barbaud** pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire depuis mon stage de Master 2 et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je suis heureuse d'avoir eu la chance de travailler avec toi, tu m'as appris énormément durant cette thèse, scientifiquement et humainement. Tu m'as fait découvrir ce sujet de thèse pluridisciplinaire et très intéressant, et m'as permis de m'épanouir dans mon parcours et approfondir mes connaissances. Merci pour ta présence, ta patience et tes précieux conseils tout au long de cette période.

Je présente ma reconnaissance à ma co-encadrante, le **Dr Hanna Hlawaty**, qui a su m'orienter vers les études les plus intéressantes et utiles en biologie pour finir ma thèse malgré le temps limité qu'il restait. J'ai eu le plaisir de travailler avec une personne optimiste, dynamique et déterminée comme toi, qui sais toujours tirer le positif de tout, et motiver ses étudiants. J'aurais souhaité sincèrement passer plus de temps avec toi et profiter de ta présence et de tes brillantes idées.

Je tiens à remercier le **Dr Didier Letourneur** pour m'avoir permis de réaliser une thèse au sein du laboratoire LVTS.

Je remercie également toutes les formidables membres de l'équipe de Villeteuse, **Frédéric et Danielle Chaubet, Murielle Maire, Isabelle Bataille, Virginie Guéguen, Valérie Boucard, Béatrice Montdargent et Thierry Avramoglou**. C'était un grand plaisir pour moi de faire partie de cette équipe. Je remercie tout particulièrement **Graciela Pavón**, grâce à qui j'ai connu le LVTS et découvert ce sujet de thèse.

Je présente mes remerciements au **Dr Alexis Fischer** pour m'avoir autorisée à accéder à la salle blanche et pour les conseils et idées qui ont été utiles dans ma thèse. Je remercie également **Amani Ouirimi** pour la formation sur l'utilisation des appareils.

Je présente ma profonde gratitude à **Rima Belibel**. Rima, je ne sais pas où commencer... Tu es une magnifique personne qui m'as toujours impressionnée avec tes qualités humaines ; toujours optimiste, toujours bienveillante et très gentille. Je te remercie énormément pour tout

ton soutien lors de mon stage, lors de ma préparation pour le concours et lors de ma thèse. Tu as, en plus, accepté d'être dans mon jury de thèse, tu es un amour !

Grand merci à **Meriem Naim**, avec qui j'ai eu le plaisir de découvrir le monde de la biologie. Merci Meriem pour ta patience et pour ton temps, si précieux, que tu as libéré pour moi. Je te souhaite bonne continuation et bon courage pour la suite de ta thèse.

Un grand merci à **Fatou** qui était la première personne à arriver dans l'équipe après moi. Tu es arrivée à un moment où je me sentais seule au laboratoire. Tu as apporté du bonheur à tout le labo avec tes conversations conviviales et ton efficacité dans le travail. Et les shopping... J'espère que nous pourrons recommencer un jour après la pandémie...

Merci à **Lucie**, ma seule collègue thésarde à Villetaneuse, avec qui j'ai eu le plaisir de partager mon bureau. Je me sentais encore moins seule avec ton arrivée après Fatou. J'appréciais beaucoup nos conversations au sujet des animaux, notamment sur Smart, et dernièrement la petite Baïne. J'espère que tu ne vas pas rester la seule thésarde du labo longtemps et que tu vas retrouver de la compagnie. Bon courage pour ta dernière année de thèse, tu y es presque !

Merci également à **Rodolphe**, qui a toujours propagé son énergie positive à toute l'équipe avec son intellectuel, sa bonne humeur et ses chansons. Faire de la musique avec ses joues est un talent rare qui se pratique uniquement par des gens extrêmement doués. J'espère que tu continues la culture des champignons et qu'ils vont bien. C'était un grand plaisir de te connaître. Je te souhaite plein de réussite dans ta carrière et dans ta vie.

Merci à **Élodie**, une maman drôle et gentille, qui a toujours des anecdotes intéressantes à raconter. Nous avons appris beaucoup de choses avec toi sur la vie. Les pauses de midi étaient plus joyeuses avec toi (ça, c'était avant...). Je te souhaite plein de bonheur avec ta famille, avec que des moments que tu vas immortaliser en les photographiant pour en créer des dizaines d'albums photos.

Les filles de Bichat, **Soraya, Fernanda, Alina, Laura** et **Marie-Noëlle**, merci pour les discussions sympas et vos précieux conseils concernant le travail.

Merci à tous les anciens stagiaires qui sont passés au laboratoire durant cette période ; **Christopher, Bryan, Fazili, Loïc, Madalina, Adrien, Johann, Mélissandre, Kahina, Ibrahim, Elmira, Esther, Guida, Sevda, Jennifer, Jean-Richard, Natacha, Marine** et **Mathis**. Le labo avait toujours une ambiance plus joyeuse en votre compagnie. Et les stagiaires actuelles, **Noéline** et **Laura**, bon courage pour la suite de vos stages et pour la suite de vos

carrières. **Pierre** et **Abbas**, j'espère que vos travaux et études vont conduire à de très bons résultats et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à mes amis **Nima, Arefeh, Aysan, Ghazaleh, Laurent, Sina, Anousha, Farhang, Mr & Mme Fazeli** (Parosh), **Saeideh, Wiktorja, Robert, Clémence, Luisa, Alexandre, Thomas, Ferhat** et **Chérifa**. Vous êtes formidables !

Merci à **Lorien, Sawsen, Martin, Kajetan** et **Floriane**, les doctorants de la SU pour toutes les discussions et partages concernant nos thèses respectives. Merci à mes camarades de Master 2, **Leonid, Valérie-Anne, David, Marie** et **Thomas** qui ont continué leurs chemins en faisant également une thèse. Bonne continuation les amis !

Un grand merci à **Alain, Michèle, Laura, Guillaume** et mes petits loulous, **Thibault** et **Maxime**. C'est un grand plaisir de partager des moments avec vous ; je vous remercie pour votre gentillesse et votre soutien.

Hugo, merci pour ta présence, pour ton grand soutien dans les moments les plus difficiles. Personne d'autre ne pourrait me comprendre mieux que toi. Tu m'as beaucoup aidée et appris durant cette période, tant humainement que techniquement. Comme tu l'as dit, la fin de nos thèses est une page qui se tourne pour laisser place à une nouvelle à écrire ensemble.

و در پایان از تمام خانواده عزیزم، به خصوص پدر و مادر مهربانم مصطفی و فریبا سپاسگزارم.

مامان جون، خاله رعنا و حسن آقا، خاله شیرین و آقارامین، دایی فریدون، دایی فرهاد و مریم جون، عمو مرتضی و زن عمو لیلا، احسان، محمد، امیر، آرینا، آریا و آدرینا. دوستان دارم و از اینکه شما را دارم خیلی خوشحتم.

خواهرانم طناز و پریرسا، در تمام این مدت با هم در یک خانه بودیم و در لحظه های تلخ و شیرین زندگی تنها همدیگر را داشتیم، همیشه پیش هم بودیم و خواهیم بود. به آرزوی رسیدن روزی که هر سه از تحصیل فارغ شده باشیم. این تحصیلات عالی دهن مهنونو سرویس کرد...

Liste des abréviations

A. pullulans	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> = microscopie à force atomique
AVC	Accident vasculaire cérébral
BMS	<i>Bare metal stent</i> = stent métallique nu
Bn	Benzyle
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> = albumine sérique bovine
CCM	Chromatographie sur couche mince
Chol	Cholestérol
CML	Cellule musculaire lisse
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CS	Chondroïtine sulfate
DAPT	<i>Dual anti-platelet therapy</i> = double traitement antiplaquettaire
DC	<i>Dip coating</i>
DCA	<i>Dynamic contact angle</i> = angle de contact en dynamique
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DES	<i>Drug eluting stent</i> = stent à élution médicamenteuse
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dRI	Indice de réfraction différentiel
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> = calorimétrie différentielle à balayage
EES	<i>Everolimus eluting stent</i> = stent à élution d'Everolimus
Fb	Fibrinogène
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FKBP	<i>FK binding protein</i>
Fn	Fibronectine
FT	Facteur tissulaire
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
GPa	GigaPascal
GAG	Glycosaminoglycane
Hex	Hexyle
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> = chromatographie liquide à haute performance
HS	Héparane sulfate
HSA	<i>Human serum albumin</i> = albumine sérique humaine
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>

HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i> = cellule endothéliale ombilicale de veine humaine
ICP	Intervention coronarienne percutanée
INT	Iodonitrotétrazolium
kDa	kiloDalton
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> = Lipoprotéine de basse densité
LS	<i>Light Scattering</i> = Diffusion de lumière
M	mol/L
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MHz	MégaHertz
MLABn	Benzyl- β -malolactonate
MPa	MégaPascal
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
N/mm ²	Newton/mm ²
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ON	Ouverture numérique
PBD	Polymère biodégradable
PBMA	Poly(n-butyl métacrylate)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Tampon phosphate salin
PC	Phosphorylcholine
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDMMLA	Poly(acide 3,3-diméthylmalique)
PDMMLA 10/90	PDMMLAH _{10-co} -Hex ₉₀
PDMMLA 20/80	PDMMLAH _{20-co} -Hex ₈₀
PDMMLA 30/70	PDMMLAH _{30-co} -Hex ₇₀
PDMMLA 40/60	PDMMLAH _{40-co} -Hex ₆₀
PDMMLA-PTX 30/10/60	PDMMLAH _{30-ter} -PTX _{10-ter} -Hex ₆₀
PE	Polyéthylène
PEG _{42-b} -PMLABn	Poly(éthylène glycol- <i>b</i> -benzyl malate)
PES	<i>Paclitaxel eluting stent</i> = stent à élution de Paclitaxel
PET	Poly(éthylène téréphtalate)
PEVA	Poly(éthylène- <i>co</i> -vinyl acétate)
PGA	Poly(acide glycolique)
PHA	Poly(hydroxyalcanoate)
PHB	Poly(hydroxybutyrate)
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique)
PLLA	Poly(L-acide lactique)
PML	Poly(acide malique- <i>co</i> -L-lactide)

PMLA	Poly(acide malique)
PMLABn	Poly(benzyl β -malolactonate)
POBA	<i>Plain old balloon angioplasty</i> = angioplastie à ballonnet simple
ppm	Partie par million
PTFE	polytétrafluoroéthylène
PTMC	Poly(triméthyl carbonate)
PTX	Paclitaxel
PU	Polyuréthane
PVDF	Poly(fluorure de vinylidène)
PVDF-HFP	Poly(fluorure de vinylidène- <i>co</i> -hexafluoropropylène)
R _a	Rugosité de surface (moyenne arithmétique)
R _f	Rapport frontal
RGD	Tripeptide arginine/glycine/aspartate
RIS	Resténose intra-stent
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROP	<i>Ring opening polymerization</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> = espèces réactives de l'oxygène
SAM	<i>Self assembled monolayer</i> = monocouche auto-assemblée
SC	<i>Spin coating</i>
SDC-4	Syndécan-4
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> = chromatographie d'exclusion stérique
SES	<i>Sirolimus eluting stent</i> = Stent à élution de Sirolimus
SIBS	Poly(styrène- <i>b</i> -isobutylène- <i>b</i> -styrène)
T _d	Température de dégradation
T _f	Température de fusion
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
T _g	Température de transition vitreuse
TGA	Analyse thermogravimétrique
THF	Tétrahydrofurane
TS	Thrombose sur stent
TTS	Thrombose tardive sur stent
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
UV/O ₃	Ultraviolet/ozone
Vn	Vitronectine
ZES	<i>Zotarolimus Eluting Stent</i> = stent à élution de zotarolimus
δ	Déplacement chimique

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du système cardiovasculaire	33
Figure 2 : Le cœur humain	34
Figure 3 : Structure du vaisseau sanguin.....	35
Figure 4 : Formation de thrombus par le collagène et le facteur tissulaire au contact du sang	37
Figure 5 : Mécanisme de formation d'une plaque d'athérome	38
Figure 6 : Formation d'une plaque d'athérome dans l'artère.....	39
Figure 7 : Illustration de l'angioplastie par ballonnet	40
Figure 8 : Etapes de l'angioplastie par stent.....	41
Figure 9 : Quelques exemples de stents métalliques.....	41
Figure 10 : Représentation schématique de la resténose intra-stent.....	42
Figure 11 : Pathophysiologie de la RIS après implantation de différents types de stents.....	43
Figure 12 : Structure chimique du Paclitaxel et du Docétaxel.....	44
Figure 13 : Représentation schématique des microtubules et l'action du Paclitaxel	45
Figure 14 : Sirolimus et quelques analogues.....	46
Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action du Sirolimus.....	47
Figure 16 : Utilisation des biomatériaux pour des applications biomédicales	52
Figure 17 : Courbe de contrainte-déformation d'un matériau.....	55
Figure 18 : Représentation schématique de l'adhérence focale d'une cellule	56
Figure 19 : Classification des PBDs d'origine naturelle et synthétique.....	58
Figure 20 : Structure du PU.....	59
Figure 21 : Structure chimique du PLGA	63
Figure 22 : Structure de l'acide malique et de différentes formes de PMLA	64
Figure 23 : Structure générale des PHAs et de quelques dérivés.....	66
Schéma 7 : Biosynthèse microbienne du PHA d'une longueur de chaîne moyenne	67
Figure 24 : Différents types de libération de principes actifs	69
Figure 25: Représentation de la structure du poly(acide [R,S]-3,3-diméthyl malique) PDMMLA	70
Figure 25 : Suivi de la polymérisation des β -lactones en PDMMLA par FTIR	75
Figure 26 : Caractérisation par RMN ^1H du copolymère de PDMMLA.....	76
Figure 1.1 : Représentation schématique de la formation d'une couche protéique sur la surface d'un biomatériau.	100
Figure 1.2 : Représentation schématique de l'adsorption protéique sur des surfaces avec différentes charges et polarités.....	101
Figure 1.3 : La structure cristalline de l'albumine sérique humaine	102
Figure 1.4 : Représentation schématique de la structure du fibrinogène	103
Figure 1.5 : Structure de la fibronectine dimère.....	104
Figure 1.6 : Représentation schématique des quatre syndécans vertébrés.....	106
Figure 1.7 : Représentation schématique de la méthode de Wilhelmy	108
Figure 1.8 : Représentation graphique de la méthode de Wilhelmy.	108
Figure 1.9 : Structure des copolymères de PDMMLA et les courbes de force (F) des expériences de blanc	110
Figure 1.10 : Profils d'adsorption/désorption (rinçage) de la BSA.....	112

Figure 1.11 : Profils d'adsorption/désorption du fibrinogène, de la fibronectine, de la vitronectine et du syndécan-4.....	113
Figure 1.12 : Variation des profils d'adhésion des protéines sur les copolymères de PDMMLA et la corrélation linéaire de F avec %A.....	116
Figure 2.1 : Représentation graphique de la dégradation de trois dérivés de PDMMLA sur une période de six mois	127
Figure 2.2 : Représentation schématique du principe du greffage covalent envisagé	127
Figure 2.3 : Structure chimique du cholestérol	129
Figure 2.4 : Structure du Paclitaxel	129
Figure 2.5 : Spectres RMN ¹ H du greffage covalent du cholestérol sur le monomère	130
Figure 2.6 : Spectres FT-IR des produits avant et après greffage du cholestérol sur le monomère	131
Figure 2.7: Nouveau terpolymère PDMMLA-Chol 30/10/60 et spectres RMN ¹ H	132
Figure 2.8 : Nouveau polymère PDMMLA-Chol et spectres RMN ¹ H.....	133
Figure 2.9 : Nouveau terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 et spectres RMN ¹ H.....	134
Figure 2.10 : Spectre COSY du terpolymère PDMMLA-PTX 10/30/60.....	135
Figure 2.11 : Spectre hétéronucléaire HSQC du PDMMLA-PTX 10/30/60	136
Figure 2.12 : Spectre hétéronucléaire HMBC du PDMMLA-PTX 10/30/60.....	137
Figure 2.13 : Nouveau copolymère PDMMLA-PTX 45/55 et spectres RMN ¹ H	138
Figure 2.14 : Courbes de TGA des dérivés de PDMMLA avant et après greffage chimique du cholestérol et du Paclitaxel	139
Figure 2.15 : Thermogrammes DSC des dérivés de PDMMLA avant et après greffage.....	140
Figure 3.1 : Courbes de l'expérience du blanc des polymères PDMMLA 40/60 [P4], PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et PLA	150
Figure 3.2 : Courbes de l'expérience du blanc de tous les polymères étudiés dans le PBS... 150	150
Figure 3.3 : Courbes d'adsorption et de désorption/rinçage de différentes protéines sur les trois polymères et les profils du blanc de tous les polymères étudiés.....	152
Figure 3.4 : Étapes du processus de <i>dip coating</i>	153
Figure 3.5 : Illustration schématique du dépôt de film polymère par <i>spin coating</i>	154
Figure 3.6: Surface d'une plaque métallique nue balayée par le profilomètre.....	155
Figure 3.7 : Balayage de la surface d'une plaque métallique, recouverte d'une couche de polymère par <i>spin coating</i>	155
Figure 3.8 : Histogramme représentant la rugosité de surface	156
Figure 3.9 : Images d'un stent métallique avant et après revêtement par le PDMMLA-PTX 30/10/60, enregistrées par le microscope optique.....	157
Figure 3.10: Histogramme représentant l'épaisseur de film polymère	158
Figure 3.11 : Chromatogrammes HPLC C18 du Paclitaxel enregistrés à 227 nm.....	161
Figure 3.12 : Droite d'étalonnage du PTX, tracée à partir de la hauteur des pics à différentes concentrations	161
Figure 3.13 : Profils de libération <i>in vitro</i> du Paclitaxel du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60	163
Figure 3.14 : Comparaison des profils de libération du Paclitaxel des trois séries.....	164
Figure 3.15: Principe du test LDH.	165

Figure 3.16 : Comparaison de la cytotoxicité des trois polymères étudiés, et le contrôle vis-à-vis des HUVECs.....	166
Figure 3.17 : Étalement des cellules HUVECS sur les surfaces des polymères et sur une surface de contrôle (fibronectine) après 2h d'incubation	167
Figure 28 : Photographie du tensiomètre à balance de Wilhelmy.....	200
Figure 29 : Photographie du nettoyeur UV/O ₃	201
Figure 30 : Photographie du <i>spin coater</i> avec l'écran de réglage	202
Figure 31 : Photographie du <i>dip coater</i>	203
Figure 32 : Photographie du profilomètre	204

Liste des schémas

Schéma 1 : Poly(ϵ -caprolactone) et sa métabolisation	59
Schéma 2 : Cycle d'acide citrique ou cycle de Krebs	60
Schéma 3 : Synthèse du PLA de haute masse molaire <i>via</i> trois voies	61
Schéma 4 : Synthèse du PGA.....	62
Schéma 5 : Synthèse du PMLA.....	64
Schéma 6 : Polymérisation anionique par ouverture de cycle de la β -lactone (malolactonate MLAR')	65
Schéma 7 : Biosynthèse microbienne du PHA d'une longueur de chaîne moyenne	67
Schéma 8 : Rétrosynthèse des β -lactones α,α,β -tri-substituées.....	71
Schéma 9 : Méthylation du 2-oxlapropionate de diéthyle.....	71
Schéma 10 : Réduction de la fonction cétone en alcool en présence du NaBH_4	72
Schéma 11 : Hydrolyse basique des groupements ester éthyliques du produit [2] et obtention du diacide [3].....	72
Schéma 12 : Monoestérification du diacide avec deux alcools différents	73
Schéma 13 : Lactonisation des monoesters <i>via</i> la réaction de Mitsunobu et obtention des lactones benzylique [6] et hexylique [7]	73
Schéma 14 : Polymérisation par ouverture de cycle des β -lactones	74
Schéma 2.1 : Synthèse de la β -lactone acide.....	126
Schéma 2.2 : Mécanisme de l'estérification de Steglich.....	128

Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	9
Liste des figures	13
Liste des schémas	17
Table des matières	19
Introduction générale.....	25
Partie I : Étude bibliographique	31
1. Généralités.....	33
1.1. Système cardiovasculaire	33
1.2. Le cœur	34
1.3. Structure d'un vaisseau sanguin.....	34
1.3.1. La tunique interne ou l'intima	35
1.3.2. La tunique moyenne ou la média.....	35
1.3.3. La tunique externe ou l'adventice	35
1.4. Maladies cardiovasculaires liées aux pathologies artérielles	36
1.4.1. L'hémostase.....	36
1.4.2. La thrombose	37
1.4.3. L'athérosclérose.....	38
2. Traitements de l'athérosclérose.....	39
2.1. Angioplastie par ballonnet	39
2.2. Stents endovasculaires	40
2.2.1. Stents métalliques nus	40
2.2.2. Resténose intra-stent	42
2.2.3. Stents à élution médicamenteuse.....	43
2.2.4. DESs de première génération	44
□ <i>Paclitaxel ou Taxol</i>	44
□ <i>Sirolimus ou Rapamycine</i>	45
□ <i>Analogues du Sirolimus, les « rapologues »</i>	47
2.2.5. DESs de seconde génération	48
2.2.6. DESs de troisième génération	49
2.2.7. DESs sans polymère.....	49
2.2.8. Stents bio-résorbables	50

3.	Développement d'un biomatériau, critères de sélection	51
3.1.	Biocompatibilité.....	51
3.2.	Propriétés de surface du biomatériau	52
	<input type="checkbox"/> <i>Fonctionnalité de la surface (composition chimique)</i>	53
	<input type="checkbox"/> <i>Energie de surface et mouillabilité de surface</i>	53
	<input type="checkbox"/> <i>Topographie/Rugosité</i>	54
3.3.	Propriétés mécaniques	54
	<input type="checkbox"/> <i>Elasticité/Rigidité</i>	54
3.4.	Adhésion cellulaire	55
3.5.	Adhésion des protéines	57
4.	Polymères biodégradables	57
4.1.	Polyuréthane	58
4.2.	Poly(ϵ -caprolactone)	59
4.3.	Poly(acide lactique)	60
4.4.	Poly(acide glycolique)	61
4.5.	Poly(acide lactique- <i>co</i> -glycolique)	62
4.6.	Poly(acide malique)	63
4.7.	Polyhydroxycanoates	66
5.	Systèmes de libération de principes actifs.....	68
5.1.	Libération brutale.....	68
5.2.	Libération pulsatile	69
5.3.	Libération contrôlée	69
6.	Etat de l'art.....	70
6.1.	Le poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA).....	70
6.2.	β -lactones α,α,β -tri-substituées	71
6.3.	Synthèse des β -lactones α,α,β -tri-substituées	71
	<input type="checkbox"/> <i>Méthylation</i>	71
	<input type="checkbox"/> <i>Réduction</i>	72
	<input type="checkbox"/> <i>Hydrolyse basique</i>	72
	<input type="checkbox"/> <i>Monoestérification du diacide</i>	72
	<input type="checkbox"/> <i>Lactonisation des monoesters</i>	73
6.4.	Dérivés de PDMMLA.....	74
	<input type="checkbox"/> <i>Polymérisation des β-lactones</i>	74
	<input type="checkbox"/> <i>Précédentes études</i>	76

Références	79
Partie II : Résultats et discussion.....	95
Chapitre 1 : Étude de l'adhésion protéique sur les dérivés de PDMMLA	97
1. Introduction	99
1.1. Intérêt de l'étude de l'adhésion des protéines sur le polymère	99
1.2. Protéines étudiées.....	101
<input type="checkbox"/> Albumine.....	101
<input type="checkbox"/> Fibrinogène	102
<input type="checkbox"/> Fibronectine	103
<input type="checkbox"/> Vitronectine	104
<input type="checkbox"/> Syndécan-4	105
1.3. Mouillabilité et énergie de surface.....	106
1.4. La méthode de Wilhelmy	107
2. Méthodologie	109
3. Résultats et discussion.....	109
3.1. Expérience de blanc	109
3.2. Adsorption/désorption des protéines.....	111
4. Conclusion.....	117
Références	119
Chapitre 2 : Greffage covalent de molécules sur la β -lactone acide et les dérivés de PDMMLA	123
1. Introduction	125
1.1. 4-carboxyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone ou β -lactone acide [8]	126
1.2. PDMMLAH _{40-co} -Hex ₆₀ , PDMMLA 40/60 [P4]	126
1.3. Homopolymère PDMMLA-H [P2].....	128
2. Méthodologie	128
Estérfication de Steglich	128
3. Résultats et discussion.....	130
3.1. Réactions de greffage covalent par l'estérfication de Steglich.....	130
3.1.1. Greffage du cholestérol	130
<input type="checkbox"/> 4-cholestéryloxy-carbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone-cholestérol). 130	
<input type="checkbox"/> PDMMLAH _{30-ter} -Chol _{10-ter} -Hex ₆₀ ou PDMMLA-Chol 30/10/60.....	131
<input type="checkbox"/> PDMMLA-Chol.....	132
3.1.2. Greffage du Paclitaxel	133

□	<i>Greffage du Paclitaxel sur la β-lactone acide</i>	133
□	<i>PDMMLAH_{30-ter}-PTX_{10-ter}-Hex₆₀ ou PDMMLA-PTX 30/10/60</i>	133
□	<i>PDMMLA-PTX 45/55</i>	137
3.2.	Analyses thermogravimétriques.....	138
4.	Conclusion.....	141
	Références	143
Chapitre 3 : Études de surface des polymères, de la libération du Paclitaxel et du comportement des cellules HUVECs		
	Introduction	147
1.	Études de surface des polymères.....	149
1.1.	Étude de l'adhésion protéique.....	149
□	<i>Expérience du blanc</i>	149
□	<i>Adsorption/désorption des protéines</i>	151
1.2.	Études de la rugosité de surface des polymères.....	153
1.2.1.	Dip coating	153
1.2.2.	Spin Coating.....	153
1.2.3.	Profilométrie.....	154
1.3.	Imagerie par microscopie optique et épaisseur du film polymère	156
2.	Étude de la libération du Paclitaxel.....	160
□	<i>Droite d'étalonnage du Paclitaxel</i>	160
□	<i>Libération du Paclitaxel</i>	162
3.	Étude biologique, comportement des cellules endothéliales.....	165
3.1.	Test de cytotoxicité LDH.....	165
3.2.	Étalement des HUVECs (<i>spreading</i>)	167
4.	Conclusion.....	169
	Références	171
Conclusion générale et perspectives.....		
	Partie expérimentale.....	179
1.	Matériels et méthodes.....	181
2.	Modes opératoires	184
2.1.	Synthèse chimique des monomères et polymères ^{1,2}	184
2.2.	Greffage covalent par le protocole d'estérification de Steglich ⁶	193
2.3.	Protocoles des analyses.....	199
	Références	206

Annexes	207
Summary of the thesis	I
Article 1	V
Article 2	XIII

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, responsables d'environ 31% des décès à l'échelle mondiale.¹ Ces maladies regroupent un ensemble de troubles, affectant le cœur et les vaisseaux sanguins.

Le laboratoire LVTS étudie les maladies cardiovasculaires et travaille dans différents domaines afin d'apporter des améliorations aux traitements de ces maladies.

Dans le cadre de cette thèse, nous travaillons sur la conception de nouveaux polyesters biocompatibles et biodégradables pour recouvrir des stents endovasculaires qui sont utilisés dans le traitement de l'athérosclérose, l'une des pathologies les plus fréquentes chez les patients. Il s'agit de la formation d'une plaque d'athérome sur la paroi interne de l'artère. Dans le cas d'une occlusion importante de l'artère, un stent vasculaire est utilisé afin de la remodeler et rétablir une circulation sanguine correcte. Le stent est déployé dans lumière de l'artère obstruée, permettant ainsi d'écraser la plaque formée et maintenir l'artère ouverte. La pose d'un stent est réalisée avec succès dans la grande majorité des cas. Néanmoins, chez 20 à 30% des patients, une resténose intra-stent (RIS) (formation d'une plaque dans le stent) est observée. Afin de limiter ce phénomène, l'une des solutions proposées est l'utilisation des polymères biodégradables pour recouvrir la surface du stent métallique. Ce revêtement sert de barrière pour éviter le contact direct du stent nu avec le milieu physiologique.

Le poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) est un nouveau polyester biodégradable que nous présentons dans ce projet et qui décrit des caractéristiques prometteuses d'un point de vue des propriétés physicochimiques et mécaniques, de la cinétique de dégradation et de la réponse cellulaire. C'est un polyester biodégradable, synthétisé à partir de ses unités monomères, les β -lactones α,α,β -tri-substituées, avec différents groupements chimiques latéraux. L'utilisation de ces β -lactones permet d'élaborer des copolymères amphiphiles de PDMMLA avec une balance hydrophile/hydrophobe modulable. La différence majeure du PDMMLA par rapport aux polymères biodégradables existant sur le marché est la présence des groupements acide carboxylique fonctionnalisables sur sa chaîne latérale. Ces groupements permettent non seulement de moduler le niveau d'hydrophilie du polymère, mais également d'effectuer une modification chimique de sa structure *via* un greffage covalent de molécules, comme des principes actifs.

Ce manuscrit est constitué de trois parties ; la première aborde l'aspect bibliographique des domaines en lien avec notre thématique de recherche. La deuxième partie présente les résultats et discussions en trois chapitres.

Dans le chapitre 1, une étude de l'adhésion protéique est effectuée sur trois dérivés de PDMMLA : le PDMMLAH_{10-co}-Hex₉₀ (PDMMLA 10/90), le PDMMLAH_{20-co}-Hex₈₀

(PDMMLA 20/80) et le PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀ (PDMMLA 30/70). L'étude consiste à mesurer la force de surface par tensiométrie grâce à la technique de mesure d'angle de contact en mode dynamique. Cette technique permet d'établir la relation entre la force et l'angle de contact formé entre la surface de l'échantillon et un liquide de référence de tension superficielle connue. Les protéines étudiées sont l'albumine sérique bovine, la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et un protéoglycane transmembranaire, le syndécan-4. Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article publié : *E. Gholizadeh, R. Belibel, L. Mora, D. Letourneur, C. Barbaud, "Small changes in PDMMLA structure influence the adsorption behavior of ECM proteins and syndecan-4 on PDMMLA derivative surfaces: Experimental validation by tensiometric surface force measurements" Colloids and Surfaces B : Biointerfaces. 193, 111031, 2020* (cf. Annexes).

Dans le chapitre 2 est évoqué le greffage chimique de molécules sur les dérivés de PDMMLA grâce à la présence des groupements acide carboxylique (-COOH). Il est dans un premier temps réalisé en utilisant une molécule modèle, le cholestérol, sur la β -lactone acide (un monomère de PDMMLA), ainsi que sur un nouveau copolymère amphiphile possédant 40% de groupements -COOH (PDMMLA 40/60) et sur l'homopolymère PDMMLA-H. La réaction de greffage covalent est effectuée suivant le protocole d'estérification de Steglich, permettant de former une liaison ester entre un groupement acide carboxylique et un groupement hydroxyle. Les résultats de cette étude sont décrits dans article publié : *E. Gholizadeh, R. Belibel, T. Bachelart, C. Bounadji, C. Barbaud, "Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications" Royal Society of Chemistry Advances. 10, 32602–32608, 2020* (cf. Annexes).

Une fois le protocole de greffage chimique validé, la réaction est réalisée en greffant un véritable principe actif sur les mêmes dérivés en suivant le même mode opératoire. Le terpolymère obtenu par le greffage du Paclitaxel sur le copolymère PDMMLA 40/60 est le PDMMLA-PTX 30/10/60, qui pourrait être le produit destiné pour des applications biomédicales.

Le chapitre 3 rassemble les résultats des études comparatives menées sur le nouveau copolymère PDMMLA 40/60, le terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 et le PLA.

Dans la partie physicochimie, l'étude de l'adhésion protéique sur les nouvelles surfaces a été pratiquée dans des conditions identiques à celles du chapitre 1. Ensuite, dans le but d'examiner la rugosité de surface de ces nouveaux dérivés de PDMMLA, une étude de surface par profilométrie a été envisagée. La surface des plaques métalliques composées d'un alliage

de cobalt-chrome a été recouverte de polymères par deux techniques : *le spin coating* et *le dip coating*, puis analysée par le profilomètre.

En parallèle, l'étude *in vitro* de la libération du Paclitaxel greffé sur le PDMMLA 40/60 est abordée afin de déterminer le profil de libération du Paclitaxel au cours du temps en présence et en absence d'enzymes. Également dans ce chapitre, une étude biologique *in vitro* est réalisée afin d'observer le comportement des cellules endothéliales vis-à-vis de ces nouveaux dérivés de PDMMLA.

Ce manuscrit apporte une conclusion générale qui récapitule l'ensemble des résultats obtenus et propose les principales perspectives qui devront être étudiées afin d'optimiser la structure et les différentes propriétés du revêtement bioactif de stents.

Enfin, la dernière partie présente en détail les conditions expérimentales et les modes opératoires employés dans la réalisation de ces expériences en laboratoire.

Partie I : Étude bibliographique

1. Généralités

1.1. Système cardiovasculaire

Constitué du cœur et des vaisseaux, le système cardio-vasculaire a pour fonction de distribuer aux organes, *via* la circulation du sang, l'oxygène et les nutriments indispensables à leur vie, tout en éliminant leurs déchets. Propulsé par les contractions rythmiques du cœur, le sang circule dans tout l'organisme à travers un réseau de vaisseaux sanguins. Trois types de vaisseaux assurent le transport du sang : les artères, les capillaires et les veines. Le sang circule, allant du cœur vers les organes et toutes les autres régions du corps *via* les artères transportant le dioxygène. Les capillaires permettent ensuite les échanges entre le sang et les cellules. Le sang est ensuite réacheminé vers le cœur par les veines²⁻⁴ (figure 1).

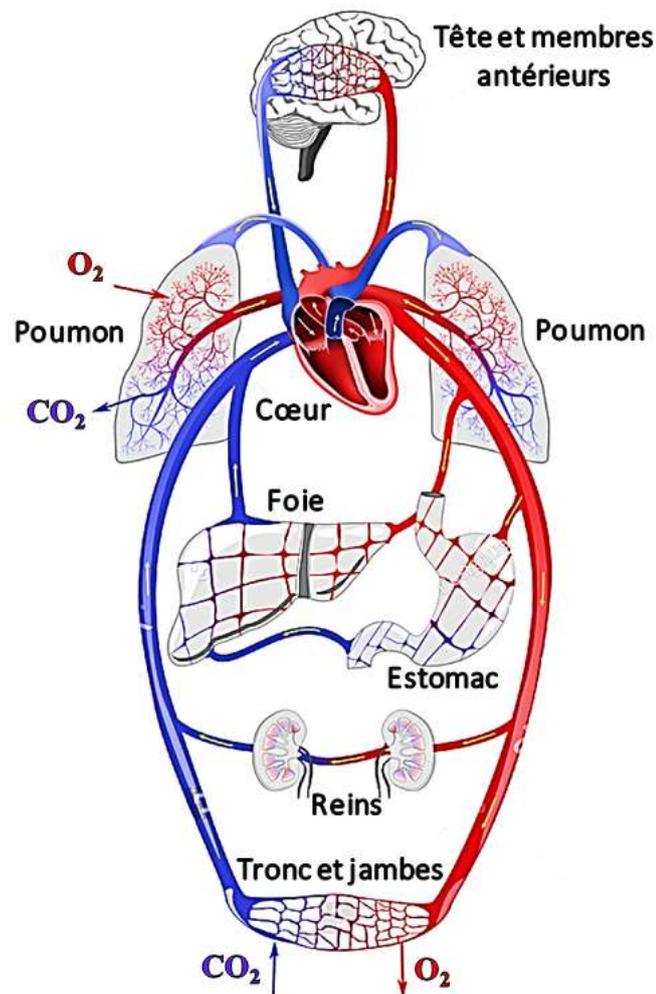


Figure 1 : Représentation schématique du système cardiovasculaire
Système circulatoire, circulation systémique (rouge) et pulmonaire (bleue)
(source : banque d'images « 123rf.com »)

1.2. Le cœur

Le cœur est le centre du système cardiovasculaire. Il propulse le sang et le fait ainsi circuler dans l'ensemble des vaisseaux sanguins du corps. Logé au centre gauche de la cage thoracique entre les poumons, le cœur est essentiellement formé d'un muscle, le myocarde, qui comprend quatre cavités : deux oreillettes, situées dans la partie supérieure, et deux ventricules, dans la partie inférieure (figure 2). Les oreillettes reçoivent le sang, tandis que les ventricules l'expulsent. Les ventricules sont séparés par des valves cardiaques, des structures élastiques fines qui s'ouvrent afin d'assurer la bonne circulation du sang, puis se referment pour l'empêcher de revenir en arrière.⁴⁻⁷

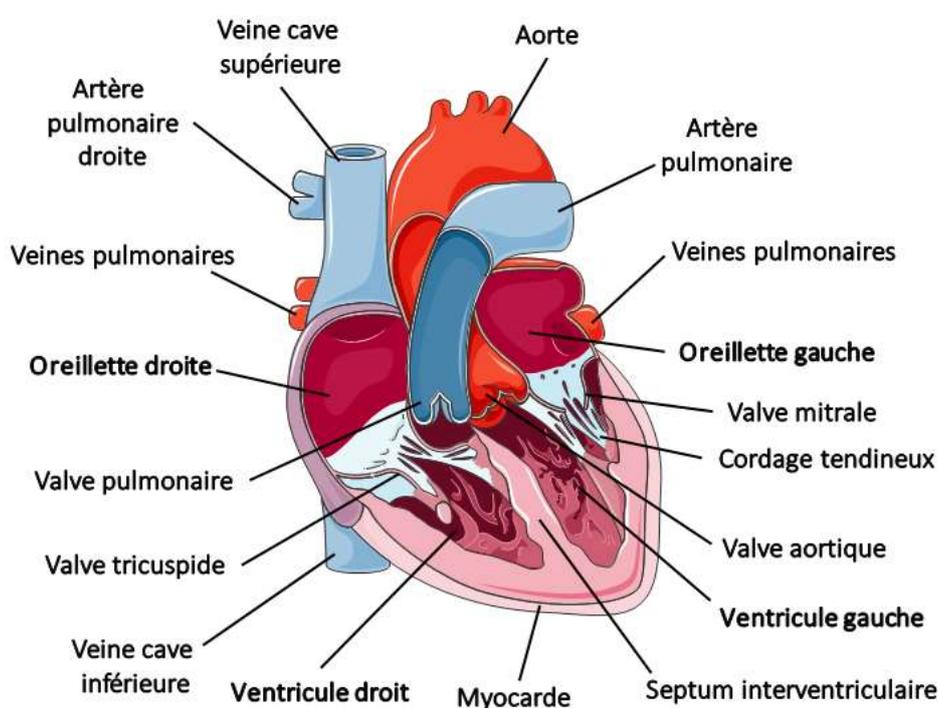


Figure 2 : Le cœur humain

La circulation du sang est établie grâce à la fonction de chaque compartiment
(Source : banque d'images « *Servier medical art* »)

1.3. Structure d'un vaisseau sanguin

Un vaisseau sanguin est constitué de trois couches ou tuniques : l'intima, la média et l'adventice (figure 3).

1.3.1. La tunique interne ou l'intima

L'intima, la plus interne des couches, est composée d'une couche de cellules endothéliales, l'endothélium, reposant sur une membrane basale et une fine couche de tissu élastique, appelée la limitante élastique interne, qui sépare l'intima de la tunique média. L'endothélium fait office de barrière entre le sang et le reste des tissus adjacents et intervient dans la modulation de l'angiogenèse, de l'hémostase, de l'inflammation, de la perméabilité et du tonus vasculaire.⁸⁻¹⁰

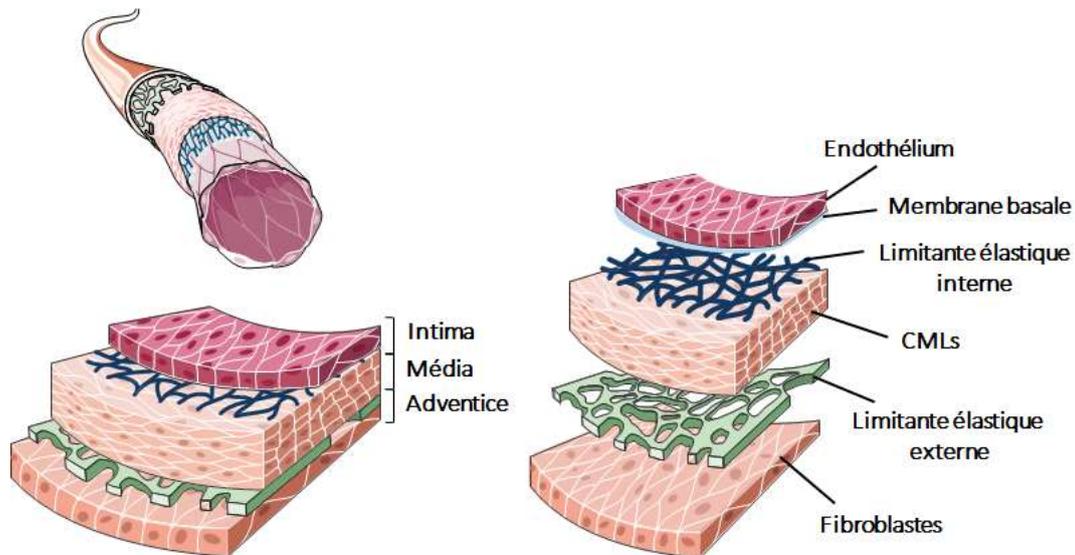


Figure 3 : Structure du vaisseau sanguin

L'artère est constituée de trois tuniques, l'intima, la média et l'adventice (*Servier medical art*)

1.3.2. La tunique moyenne ou la média

Constituée essentiellement des cellules musculaires lisses (CMLs) et de l'élastine, la média est la couche la plus épaisse de l'artère. Les CMLs, le collagène et les protéoglycanes sont situés entre les feuillets d'élastine. La contractilité des CMLs permet à cette tunique de réguler le flux sanguin *via* les variations de diamètre des vaisseaux. En effet, la contraction des CMLs induit une vasoconstriction et le relâchement de ces derniers induit une vasodilatation.^{8,10,11} La média est séparée de l'intima et de l'adventice respectivement par la limitante élastique interne et la limitante élastique externe.

1.3.3. La tunique externe ou l'adventice

L'adventice, la plus externe des couches, contient essentiellement de la matrice extracellulaire riche en collagène, produite par les fibroblastes. L'adventice regroupe également

les nerfs périvasculaires, les tissus conjonctifs et les *vasa vasorum* (petits vaisseaux assurant la vascularisation de la paroi artérielle). Le collagène et l'élastine, situés dans la média et l'adventice, assurent l'élasticité du vaisseau vis-à-vis du flux sanguin et de la tension artérielle.^{8,12,13}

1.4. Maladies cardiovasculaires liées aux pathologies artérielles

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, avec un taux de mortalité moyen de 17.9 millions de personnes par an. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 85% des décès cardiovasculaires sont issus d'une crise cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral (AVC).¹⁴ L'insuffisance cardiaque, l'AVC, l'ischémie, l'infarctus du myocarde, ou encore l'artériopathie (ou artérite) des membres inférieurs sont parmi des maladies cardiovasculaires les plus connues, liées aux pathologies artérielles ou veineuses.

L'athérosclérose est reconnue comme la cause principale de la plupart des pathologies mentionnées.^{15,16} Il s'agit d'un rétrécissement de la lumière artérielle issu de la formation d'une plaque d'athérome au niveau sous-endothélial de l'intima. Afin de mieux comprendre le mécanisme de cette pathologie, il est d'abord nécessaire de connaître le mécanisme l'hémostase, la réponse immunitaire du corps à une blessure ou une lésion, plus spécifiquement au niveau d'un vaisseau sanguin, ainsi que le mécanisme de formation d'un thrombus (thrombose).

1.4.1. L'hémostase

L'hémostase est le nom donné à un ensemble de phénomènes naturels permettant la coagulation du sang en cas de lésion, de choc ou d'intervention chirurgicale. Elle se produit dans le cas d'endommagement de la paroi artérielle ou de l'endothélium, où les plaquettes et le fibrinogène entrent en action pour réparer la zone de brèche.¹⁷

Le collagène, initialement situé dans le sous-endothélium et le facteur tissulaire, situé au niveau de la média et de l'adventice, permettent de maintenir le système circulatoire à haute pression. Dans le cas d'une blessure, ces derniers entrent en contact avec le sang et interviennent dans le processus de coagulation.¹⁸

La cascade de coagulation commence par l'adhésion des plaquettes au collagène du vaisseau sanguin au niveau de la blessure. Cela forme un clou plaquettaire temporaire pour

endiguer le saignement (hémostase primaire). Puis, le facteur tissulaire enclenche la formation de la thrombine, enzyme transformant le fibrinogène en filaments de fibrine insolubles, qui viennent stabiliser le caillot plaquettaire (hémostase secondaire) (figure 4).¹⁹

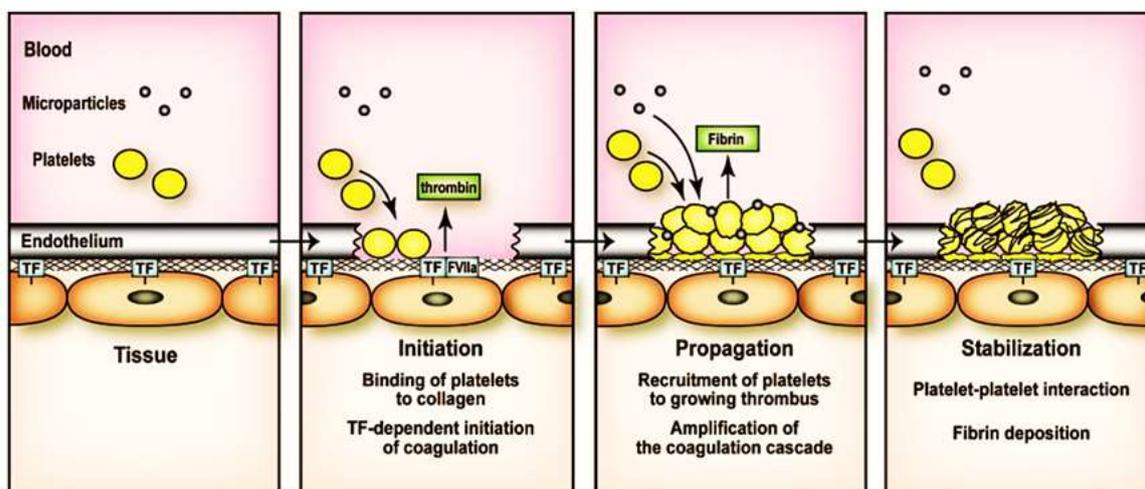


Figure 4 : Formation de thrombus par le collagène et le facteur tissulaire au contact du sang
Le caillot de fibrine formé sur la zone de lésion permet d'arrêter le saignement.¹⁹

Une fois l'hémostase terminée, le caillot de fibrine est éliminé avec l'action de la plasmine qui dissout et rend soluble la molécule de fibrine. Cette étape, appelée la fibrinolyse, contribue également à la réparation complète du vaisseau lésé et est essentielle pour maintenir l'intégrité vasculaire.¹⁷

1.4.2. La thrombose

La thrombose est définie comme la formation d'un caillot sanguin dans les vaisseaux ou les artères. Les fondamentaux du mécanisme de formation du caillot se rapprochent beaucoup de ceux de l'hémostase. Cependant, l'intensité de la thrombose est bien plus importante ; elle peut se produire même en cas d'absence de lésion et peut être liée à un état de santé sous-jacent. La thrombose se produit lorsqu'un caillot se forme à l'intérieur d'un vaisseau au lieu de l'endroit où la paroi du vaisseau a été endommagée par une blessure, et peut survenir dans les artères ou les veines. La thrombose artérielle est la cause sous-jacente de la plupart des crises cardiaques et des accidents vasculaires cérébraux. Le thrombus veineux ou la thrombose veineuse profonde peut se rompre et se déplacer vers les poumons et produire une embolie pulmonaire.^{20,21}

1.4.3. L'athérosclérose

L'athérosclérose résulte de la formation d'une plaque d'athérome au niveau des couches constituant l'artère. Le risque d'athérosclérose augmente avec l'augmentation du taux de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (LDL). Les facteurs génétiques, la sédentarité, l'hyperglycémie, l'hypertension, l'obésité, le tabagisme et le stress oxydatif sont connus comme étant les facteurs de risque principaux de l'athérosclérose.^{22,23}

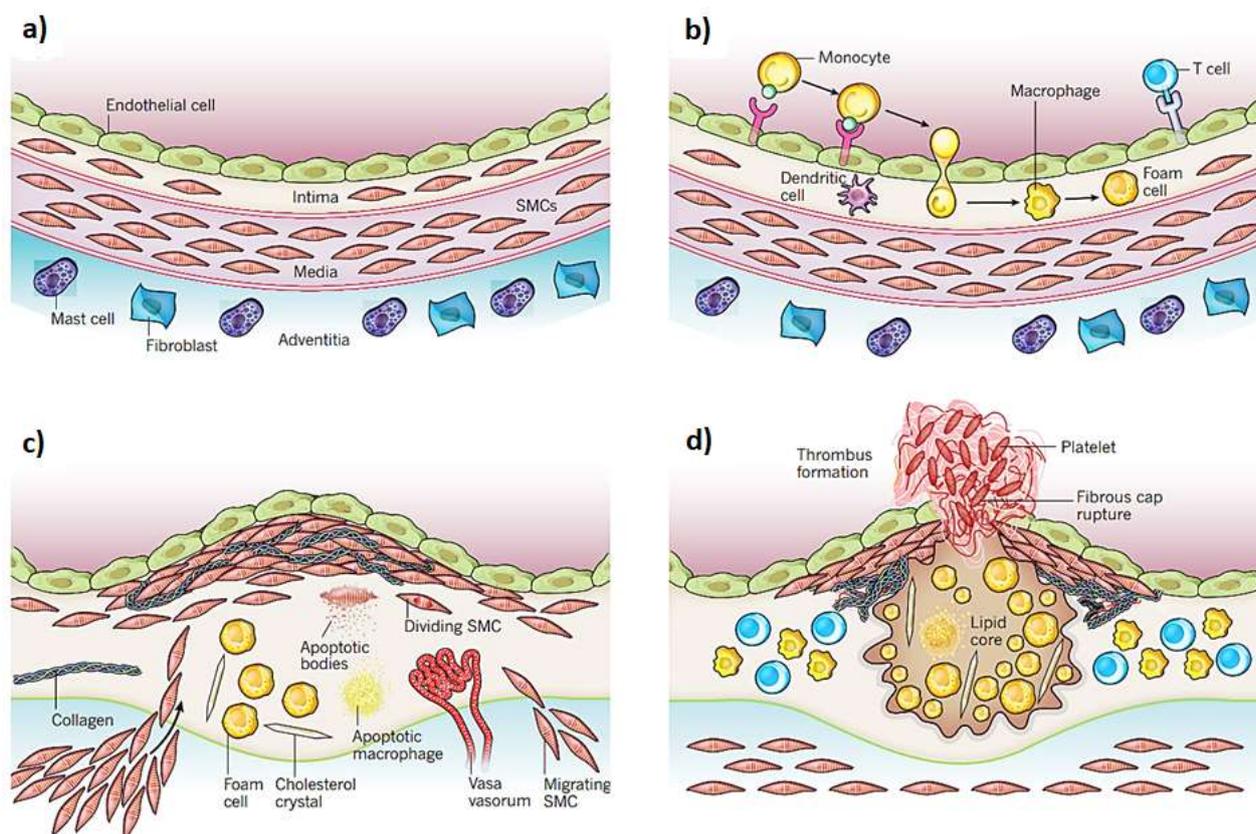


Figure 5 : Mécanisme de formation d'une plaque d'athérome

a) Artère normale ; b) Début de la formation de plaque : adhésion des monocytes et leur transformation en macrophages, puis en cellules spumeuses ; c) Migration des CMLs de la média vers l'intima et leur prolifération, production des macromolécules de la matrice extracellulaire comme le collagène, l'élastine, etc. d) Rupture de la chape fibreuse de la plaque d'athérome et formation d'une thrombose avec l'activation des plaquettes et la formation des filaments de fibrine²⁴

La figure 5 illustre les étapes de la formation d'une plaque d'athérome. Sous l'effet du stress oxydatif, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion et libèrent des cytokines et des chimiokines. Les chimiokines attirent les monocytes circulant dans le sang, qui s'attachent à l'endothélium *via* les molécules d'adhésion. Transmigrés dans la zone sous-endothéliale, les monocytes se transforment en macrophages. Lorsque le taux de cholestérol LDL est élevé, ce dernier s'infiltré également dans la zone sous-endothéliale où il est oxydé ou modifié. Les macrophages accumulent ensuite le cholestérol LDL oxydé, formant les cellules

spumeuses, conduisant à l'athérogénèse. L'endothélium sécrète alors des facteurs de croissance sous l'effet des lipides oxydés. Les CMLs migrent de la média vers l'intima, y prolifèrent et produisent de la matrice extracellulaire. Le cholestérol LDL oxydé est alors davantage transformé en cellules spumeuses, contribuant à la formation de la plaque d'athérome.^{22,24,25}

La diminution de la lumière artérielle par le grossissement de la plaque d'athérome limite la circulation correcte du sang (figure 6), provoquant des pathologies importantes comme l'infarctus du myocarde, les AVCs, ou encore l'artérite.

Dans le cas d'une occlusion importante, les endoprothèses ou stents vasculaires sont utilisés afin de remodeler l'artère et rétablir une circulation sanguine correcte. Le stent est posé dans la lumière de l'artère, permettant d'écraser la plaque formée et maintenir l'artère ouverte.

L'athérosclérose devient fatale accompagnée d'une thrombose provoquée par une rupture de la plaque d'athérome.^{26,27}

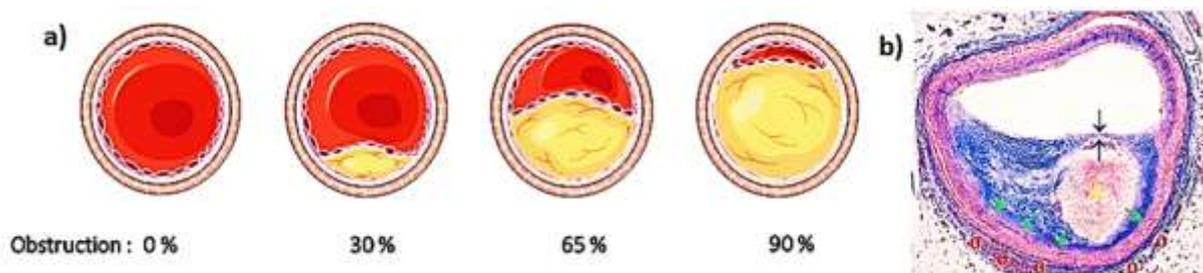


Figure 6 : Formation d'une plaque d'athérome dans l'artère

a) Représentation schématique de l'évolution de la plaque d'athérome ; b) Une plaque d'athérome formée dans une artère, la chape fibreuse susceptible à une rupture est montrée par les flèches bleues. (Servier medical art)

2. Traitements de l'athérosclérose

2.1. Angioplastie par ballonnet

Réalisée pour la première fois en 1977,²⁸ l'angioplastie coronaire par ballonnet, appelée également «*Plain Old Balloon Angioplasty*» (POBA), est une opération permettant d'élargir le vaisseau rétréci, afin d'améliorer la circulation sanguine. Le ballonnet placé au bout d'un cathéter est introduit dans l'artère malade à partir de l'artère radiale (située au poignet) ou l'artère fémorale (située au niveau de l'aîne). Le ballonnet est d'abord gonflé pour dilater le vaisseau, puis dégonflé et retiré (figure 7).²⁹

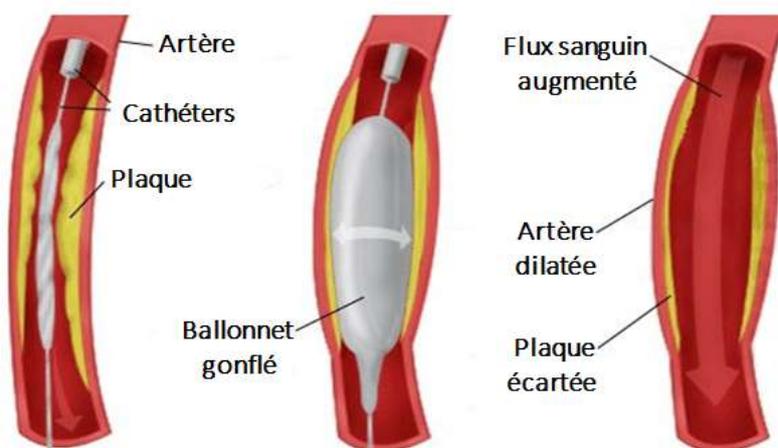


Figure 7 : Illustration de l'angioplastie par ballonnet

Le ballonnet est gonflé afin d'écraser la plaque d'athérome, puis dégonflé et retiré.²⁹

2.2. Stents endovasculaires

2.2.1. Stents métalliques nus

Malgré le succès considérable de la POBA, des complications sont observées après intervention. Le recul brutal du vaisseau par exemple, est l'une des complications majeures de la POBA, qui peut survenir lors de l'opération ou postérieurement. Toutes ces complications peuvent conduire à une nouvelle angioplastie ; une chirurgie cardiaque en urgence, un infarctus du myocarde, voire un décès.^{30,31}

Les solutions proposées afin d'éviter ces complications se posent sur la limitation de l'agrégation des plaquettes et la formation de thrombus, comme l'utilisation des agents anti-plaquettaires.³¹

L'utilisation d'un stent métallique a été mise en place pour éviter le problème de recul élastique de l'artère après une POBA.³² Le stent est un grillage métallique qui est posé dans la lumière de l'artère et reste en place à vie (figure 8). La pose d'un stent augmente la probabilité que l'artère reste ouverte après une intervention coronarienne percutanée.³³ L'élasticité de la paroi artérielle produit un recul quand on tente une dilatation de l'orifice de la branche latérale par ballonnet. Le stent permet d'éviter cette réaction de retour élastique du vaisseau (*elastic recoil*) après dilatation.^{33,34}

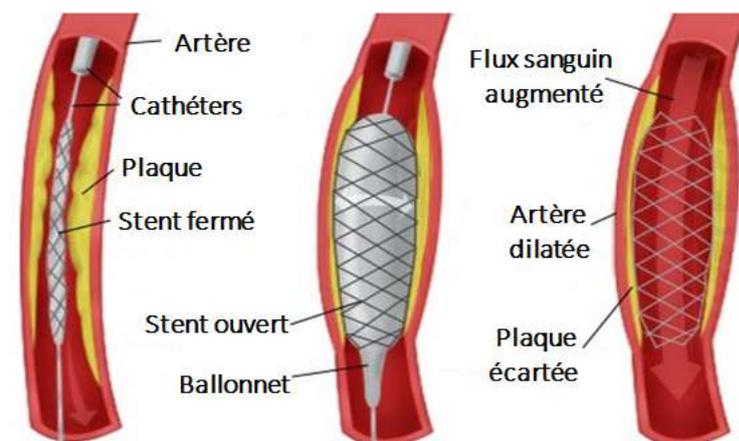


Figure 8 : Étapes de l'angioplastie par stent

L'utilisation du stent métallique permet d'éviter le phénomène de retour élastique de l'artère.²⁹

Le premier stent implanté chez l'homme en 1986, appelé WALLSTENT® (Schneider AG) était conçu en acier inoxydable.³⁵ Les difficultés techniques rencontrées lors de la pose du stent ont limité son utilité clinique et il a été retiré du marché en 1991. En 1987, le premier stent approuvé par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) a été développé : Palmaz-Schatz® (Johnson & Johnson), le premier stent expansible par ballonnet fabriqué en acier inoxydable.³⁶ ³⁷ Quelques exemples de stents métalliques avec différentes géométries sont présentés dans la figure 9.

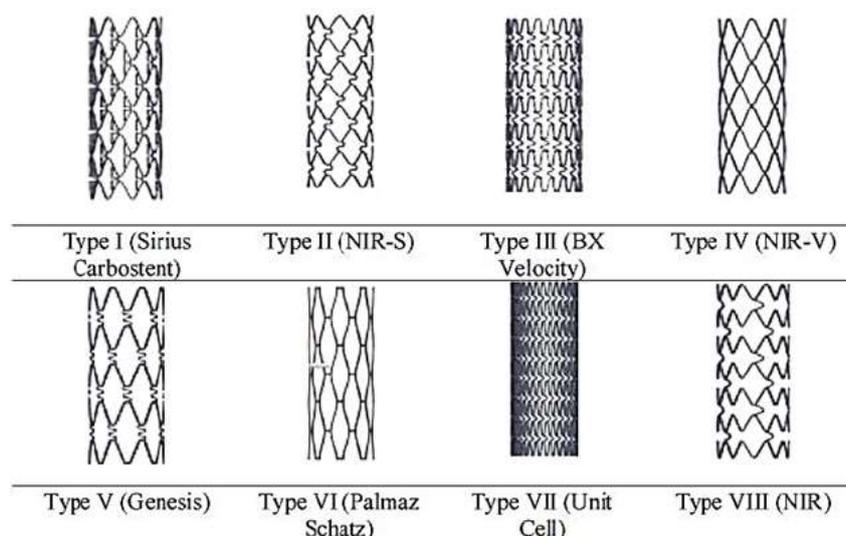


Figure 9 : Quelques exemples de stents métalliques

Différents motifs sont utilisés dans la fabrication de l'armature des stents ³⁸

Malgré les avantages de cette méthode comparée à la POBA, l'utilisation des stents nus n'est pas sans inconvénient. Le risque de resténose (20 à 30% des cas) et de thrombose subaiguë de stent nécessitent la prescription d'importantes doses de médicaments anticoagulants conduisant à d'importantes hémorragies chez les patients.^{39,40}

2.2.2. Resténose intra-stent

La pose de stent est réalisée avec succès pour la grande majorité des patients, néanmoins, dans 20 à 30% des cas une resténose intra-stent (RIS) est observée (figure 10).

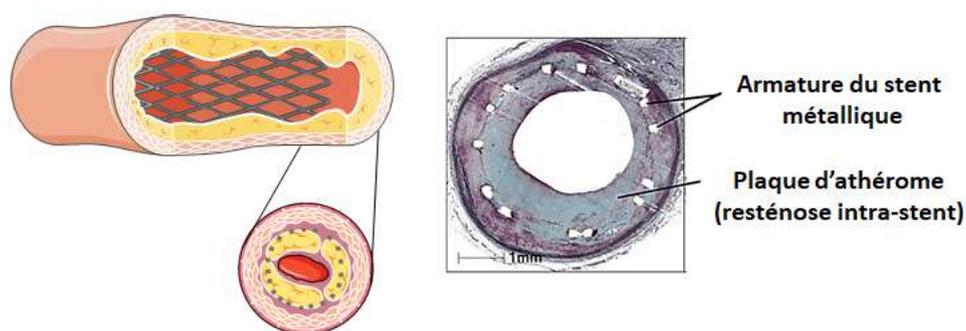


Figure 10 : Représentation schématique de la resténose intra-stent

Reformation de la plaque autour du stent métallique. La lumière artérielle diminue à nouveau par la reformation d'une plaque autour du stent.⁴¹ (Servier medical art)

Le stent métallique étant un corps étranger, le système immunitaire enclenche une réponse inflammatoire contre la présence de ce dernier. De plus, la pose de stent cause un endommagement de la paroi artérielle lors de l'opération.^{42,43} L'agrégation des plaquettes et des fibrines sur la zone de blessure (mécanisme de l'hémostase/thrombose), la migration des CMLs de la média vers l'intima et leur prolifération sont à l'origine de l'hyperplasie néo-intimale, la phase précoce de l'athérosclérose.^{44,45} L'endommagement de la paroi artérielle sur la zone de blessure entraîne l'arrivée des monocytes, des neutrophiles, et la transformation des monocytes en macrophages ; ces derniers favorisant la migration et la prolifération des CMLs par la libération des facteurs de croissance.^{46,47}

Avec la reformation de la plaque d'athérome par RIS chez les patients, la lumière artérielle diminue à nouveau, et restreint la circulation sanguine. Dans certains cas, une seconde angioplastie (par athérectomie) ou une pose d'un second stent peut devenir nécessaire.

2.2.4. DESs de première génération

La première génération des DESs consistait à recouvrir le stent métallique avec un médicament actif incorporé dans un polymère. Le Paclitaxel et le Sirolimus étaient utilisés comme agents actifs, présentant chacun un mécanisme d'action différent pour limiter la RIS^{51,52} et ainsi la migration et la prolifération des CMLs.

Le CYPHER® [Cordis, Milpitas, CA] et le TAXUS® [Boston Scientific, Marlborough, Massachusetts] étaient les principaux DESs de première génération couverts de Sirolimus (« *Sirolimus Eluting Stent* » (SES)) et de Paclitaxel (« *Paclitaxel Eluting Stent* » (PES)) respectivement.^{53,54}

• Paclitaxel ou Taxol

Le Paclitaxel est un agent anti-tumeur approuvé par la FDA, extrait de l'écorce d'if pacifique *Taxus brevifolia* en 1971 (figure 12). Il est utilisé pour le traitement du cancer de l'ovaire, du poumon, de la prostate, du sein et des tumeurs solides.⁵⁵ Il est également utilisé comme agent antiprolifératif dans le développement des DESs, car il empêche la prolifération et la migration des CMLs et donc la formation de néo-intima conduisant à une RIS.^{56,57}

Le cycle « taxane » du Paclitaxel (et autres membres de la famille des taxanes) est un élément essentiel de l'action anti-tumeur de cette molécule.⁵⁸ Le Docétaxel est un analogue du Paclitaxel, extrait des feuilles d'if européen *Taxus baccata*.

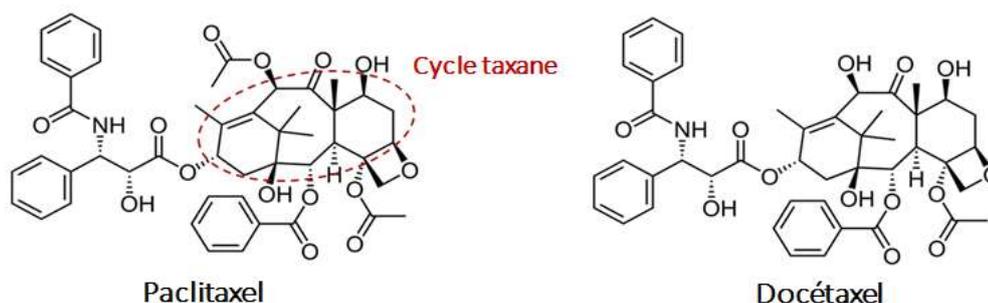


Figure 12 : Structure chimique du Paclitaxel et du Docétaxel

La partie taxane interrompt la mitose et conduit à une apoptose cellulaire.⁵⁸

Le mécanisme d'action du Paclitaxel est décrit par la stabilisation des microtubules, des composants cytosquelettiques, qui résultent de l'auto-assemblage longitudinal tête-à-queue des tubulines, des hétérodimères constitués des sous-unités α et β (figure 13). Le rôle des microtubules est essentiel pour la mitose cellulaire, pour maintenir l'organisation spatiale des

organelles, la forme de la cellule, sa motilité et le trafic intracellulaire des vésicules au niveau des cellules eucaryotes.^{59,60} Les extrémités d'un microtubule montrent des dynamismes différents : la polymérisation des tubulines continue sur l'extrémité positive (sous-unités β) et la dépolymérisation continue sur l'extrémité négative (sous-unités α). La partie « taxane » du Paclitaxel se lie aux β -tubulines, stabilise le microtubule par blocage de l'étape de dépolymérisation et interrompt la mitose cellulaire. La division et la prolifération cellulaires sont alors arrêtées, conduisant à l'apoptose de la cellule.⁵⁸

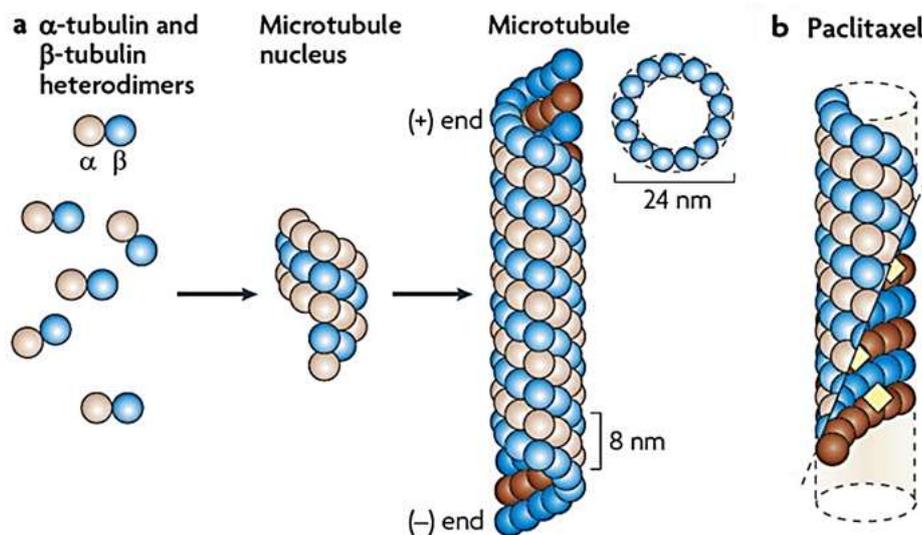


Figure 13 : Représentation schématique des microtubules et l'action du Paclitaxel

a) Composition et organisation des microtubules, b) Sites de liaison du Paclitaxel représenté en jaune. Le Paclitaxel ou plus généralement les taxanes se lient aux tubulines β sur la surface luminale du microtubule et empêchent sa dépolymérisation.⁶¹

L'utilisation du Paclitaxel dans le développement des DESs est particulièrement intéressante, car sa structure hydrophobe permet une meilleure absorption de ce dernier dans la paroi artérielle, permettant ainsi une action antiproliférative plus adéquate. Les résultats des études montrent que les liaisons hydrophobes de cette molécule avec la paroi favorisent son transfert du sang vers le tissu artériel.^{62,63} L'action du Paclitaxel inhibe la prolifération des CMLs et des fibroblastes, la migration des CMLs, des fibroblastes et des globules blancs, limitant l'hyperplasie néo-intimale et donc la RIS.

- **Sirolimus ou Rapamycine**

Le Sirolimus (figure 14) est un métabolite secondaire découvert pour la première fois en 1975 comme produit de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* dans un échantillon de terre à

l'île de Pâques (Rapa Nui).^{64,65} Initialement, le Sirolimus était utilisé en tant qu'agent antifongique, mais plus tard, avec la découverte de ses propriétés antibiotiques, antiprolifératives et immunosuppressives, son utilisation a été appliquée dans d'autres domaines, comme par exemple contre le rejet dans lors d'implantation d'organes. Il est approuvé par la FDA pour utilisation dans le traitement des maladies cardiovasculaires.⁶⁴

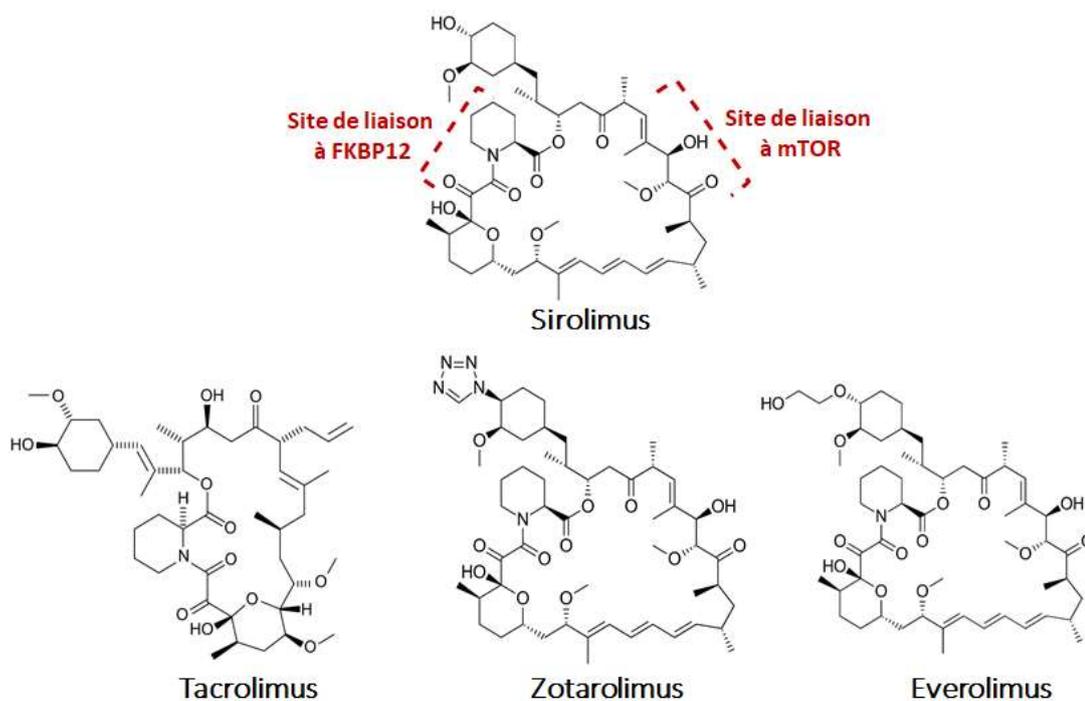


Figure 14 : Sirolimus et quelques analogues

Les membres de cette famille comportent deux sites de liaison pour les protéines FKBP12 et mTOR.⁶⁴

Le Sirolimus inhibe l'activation des lymphocytes T et la prolifération en réponse à une stimulation antigénique. La protéine de liaison du Sirolimus est appelée « *mammalian target of rapamycin* » (mTOR), une protéine kinase de sérine-thréonine, qui contrôle la croissance cellulaire, l'autophagie (dégradation lysosomale du contenu cellulaire), la translation et la transcription des protéines.^{66,67} Une dérégulation dans l'activation de cette dernière provoque un cancer.⁶⁸ Il existe deux formes de complexes de mTOR : le mTOR complexe 1 (mTORC1) (sensible au Sirolimus), et le mTOR complexe 2 (mTORC2) (insensible au Sirolimus). Le Sirolimus se lie à son récepteur intracellulaire « FK binding protein 12 » (FKBP12). Ensuite, le complexe formé se lie à mTOR, ce qui entrave l'association de ce dernier avec le mTORC1, bloque sa signalisation et donc le cycle cellulaire (figure 15).^{64,67,69}

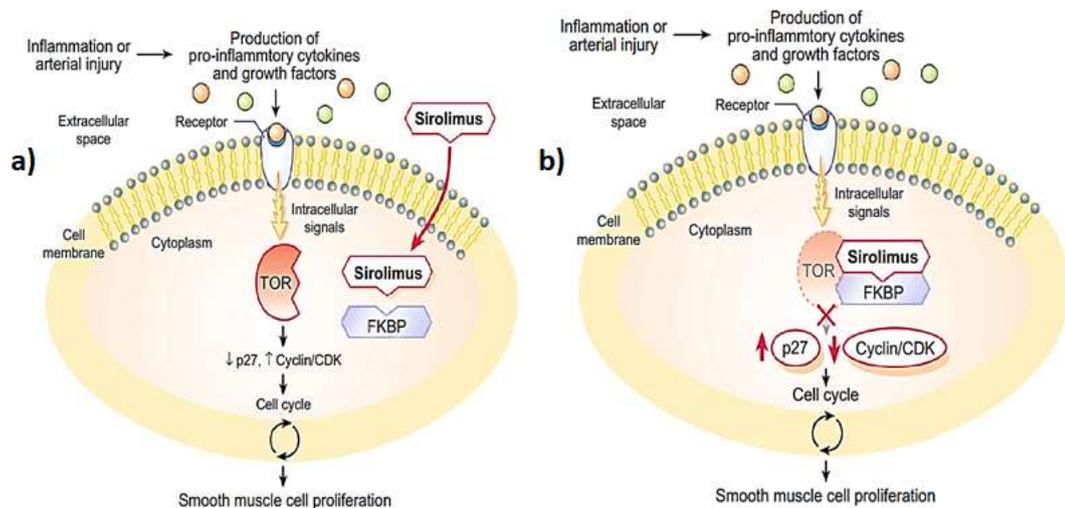


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action du Sirolimus

a) Liaison au FKBP12 et formation du complexe Sirolimus-FKBP12, b) Liaison du complexe formé à mTOR et blocage du cycle cellulaire ⁶⁹

- **Analogues du Sirolimus, les « rapalogues »**

La découverte du récepteur mTOR et le mécanisme d'action du Sirolimus ont conduit au développement des analogues de ce dernier. Ces analogues, également appelés « rapalogues » sont le Zotarolimus (codé ABT-578), le Tacrolimus (FK-506), l'Everolimus (RAD-001), le Temsirolimus (CCI-779), le Biolimus (BA9), ou encore le Ridaforolimus (L01XE19).^{70,71} Quelques analogues de Sirolimus sont présentés dans la figure 14.

Administré par voie orale, l'Everolimus inhibe la prolifération de différentes cellules tumorales humaines ainsi que les cellules endothéliales humaines ou « *human umbilical vein endothelial cells* » (HUVECs) *in vitro*. Il est utilisé dans le traitement de la sclérose tubéreuse,⁷² du cancer du sein avancé positif aux récepteurs hormonaux post-ménopausiques,⁷³ des tumeurs neuroendocrines progressives d'origine pancréatique,⁷⁴ ou encore dans les DESs.^{75,76}

Le Zotarolimus est un autre analogue semi synthétique du Sirolimus avec un groupement tétrazole au lieu de l'hydroxyle, qui rend la molécule plus hydrophobe que le Sirolimus et permet donc un temps de rétention tissulaire plus important et une meilleure perméabilité de la membrane cellulaire.^{77,78} Le Zotarolimus est exclusivement utilisé dans les DESs « Endeavor » et « Resolute ».^{79,80}

Le Biolimus, un autre analogue du Sirolimus est également utilisé dans le développement des DESs « Biomatrix » et « Noburi ».^{78,81}

Si dans un premier temps des tests cliniques ont prouvé que le Paclitaxel et le Sirolimus diminuent tous deux remarquablement la RIS en comparaison aux stents nus, des rapports ont par la suite mis en évidence l'augmentation du risque de la thrombose sur stent. Ce phénomène résulte de l'action de l'agent actif sur la prolifération des CMLs et aussi des cellules endothéliales. En effet, le retard engendré sur la prolifération des cellules endothéliales empêche la revascularisation de la paroi artérielle sur la zone lésée, donnant lieu à une agrégation plaquettaire. Par la suite, la migration et la prolifération des CMLs entraînent une thrombose tardive sur stent⁸² nécessitant un traitement antiplaquettaire. Le double traitement antiplaquettaire ou « *Dual Antiplatelet Therapy* » (DAPT) est recommandé pour une durée d'au moins 12 mois après l'implantation de DES, sauf pour les patients avec un risque élevé d'hémorragie.⁸³ Il requiert l'utilisation de l'aspirine et d'une thiényopyridine, correspondant à des antagonistes d'adénosine diphosphate (ADP) au niveau du récepteur P2Y₁₂, une protéine qui intervient dans l'hémostase (plus particulièrement l'hémostase primaire). Cette classe d'antiagrégants regroupe trois molécules : le Clopidogrel, la Ticlopidine et le Prasugrel.^{84 85} Des études ont montré que la poursuite d'une DAPT au-delà de 12 mois n'est pas bénéfique pour les patients⁸⁶ et augmente le risque d'infarctus du myocarde et de décès cardiaque.⁸⁷

2.2.5. DESs de seconde génération

Les DESs de seconde génération ont connu plusieurs améliorations par rapport à leurs prédécesseurs. Les alliages cobalt-chrome (Co-Cr) et platine-chrome (Pt-Cr) ont été adoptés comme nouveaux matériaux pour la construction du squelette du stent. L'épaisseur de l'armature du stent peut ainsi être diminuée, permettant une meilleure flexibilité.^{39,53}

La biocompatibilité des polymères utilisés a également été améliorée.⁴⁹ Dans le cas des DESs de première génération, l'agent actif était incorporé dans un polymère synthétique durable et non-dégradable, comme le poly(éthylène-*co*-acétate de vinyle) (PEVA), le poly(styrène-*b*-isobutylène-*b*-styrène) (SIBS), ou encore le poly(*n*-butyl méthacrylate) (PBMA).⁸⁸ Ces polymères ont été remplacés par d'autres polymères, biocompatibles, comme le polymère de phosphorylcholine (PC), ou un copolymère fluoré comme le poly(fluorure de vinylidène-*co*-hexafluoropropylène) (PVDF-HFP).⁸⁹ Ainsi, la biocompatibilité du polymère est maximisée et l'inflammation due aux polymères précédemment utilisés est minimisée.

Quant aux médicaments actifs, les composés de la famille « -limus » (analogues du Sirolimus) ont été employés comme le Zotarolimus, l'Everolimus, le Biolimus, le Tacrolimus, etc.⁹⁰ Le Zotarolimus et l'Everolimus ont été mis en avant en particulier grâce à leurs propriétés d'immunosuppresseur similaires à celles du Sirolimus et leurs lipophilie plus importante.⁴⁹ On

peut citer les stents ENDEAVOR *Zotarolimus Eluting Stent* (ZES) et Xience-V/Promus *Everolimus Eluting Stent* (EES) comme exemples de DESs de seconde génération.^{77,91}

2.2.6. DESs de troisième génération

Bien que les DESs de seconde génération soient plus efficaces pour limiter la RIS, le risque de thrombose tardive sur stent était toujours présent à cause de la nature thrombogène des polymères durables dans l'artère et demandait une DAPT sur du long terme. Des groupes de recherche ont alors opté pour l'utilisation de polymères biocompatibles, mais également biodégradables pour recouvrir la surface du métal, offrant ainsi au stent à la fois les avantages du stent nu et du DES. Le corps métallique écarte l'artère et la plaque en évitant le retour élastique, et le polymère se dégrade au fur et à mesure du temps après avoir servi de support pour l'accueil de l'agent actif et sa libération. Cela réduirait la probabilité de thrombose tardive issue de l'inflammation causée par la présence permanente du polymère, ainsi que la durée de la DAPT nécessaire après l'intervention.⁹²

Le polymère biodégradable assure l'éluion complète du principe actif et s'élimine complètement pendant et/ou après la libération de ce dernier. Les biopolymères les plus connus sont le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) et la poly(caprolactone) (PCL).^{48,93} Le « BioMatrix Flex » est le premier DES biodégradable recouvert de PLA, portant le Biolimus comme agent actif.^{94,95}

2.2.7. DESs sans polymère

Les DESs sans polymère sont développés dans le but d'éviter la thrombose tardive issue de la présence durable du polymère sur la zone traitée. Ce stent aurait donc les avantages du stent nu (retour élastique et occlusion brutale de l'artère) avec un risque réduit de resténose et de thrombose par rapport aux DESs avec polymère.⁹⁶

Etant donné que le polymère sert de plateforme d'accueil pour l'agent actif et joue un rôle dans la libération de ce dernier, sa suppression nécessite une modification de la surface métallique du stent.³⁹ L'actif est alors déposé directement sur la surface microporeuse ou nanoporeuse du stent lors de sa construction. La cinétique de libération dépend alors de la solubilité de l'actif, du coefficient de diffusion du milieu de libération et de l'épaisseur de la

couche d'actif.⁹⁷ À titre d'exemple, le YUKON CHOICE® (Translumina) est un stent en acier inoxydable avec une surface microporeuse chargée de Sirolimus.

L'encapsulation du principe actif dans une matrice de nanoparticules, la cristallisation de l'actif sur le stent, ou encore la modification de la surface en utilisant des monocouches auto-assemblées, « *Self-Assembled Monolayers* » (SAMs) sont d'autres techniques pour recouvrir un stent sans polymère.⁹⁸

Les DESs sans polymère présentent de bons résultats au niveau des tests précliniques et cliniques, néanmoins, ils ne montrent pas une meilleure performance que les DESs de seconde génération recouverts de polymères, en termes de réduction du risque de thrombose tardive. Ils sont donc considérés efficaces, mais les résultats cliniques de ce stent ne sont pas suffisants pour prouver avec évidence des qualités supérieures de celui-ci comparé aux DESs.^{98,99}

2.2.8. Stents bio-résorbables

Le stent bio-résorbable est conçu d'un support transitoire en utilisant soit un polymère biodégradable, soit un métal biodégradable plutôt qu'un métal permanent. Une couche de polymère biodégradable est ajoutée sur ce support, accompagnée d'un agent antiprolifératif.^{97,100} Le stent bio-résorbable agit alors comme les DESs précédemment décrits : l'échafaudage (*scaffold*) écarte l'artère et la stabilise pendant que l'agent antiprolifératif est élué. Puis, après la revascularisation complète de la paroi artérielle, l'échafaudage se dégrade intégralement. Cela permettrait un remodelage plus naturel de l'artère en ne laissant aucun résidu de polymère ou de métal sur place⁹⁴ et réduirait ainsi le risque de thrombose tardive sur stent, et donc le besoin de suivre un DAPT après intervention.

Le squelette du stent bio-résorbable est généralement construit de poly(acide L-lactique) (PLLA) ou d'un alliage de magnésium. Le PLLA se dégrade par l'hydrolyse des liaisons ester et les produits de dégradation sont métabolisés par le pyruvate en dioxyde de carbone et eau, *via* le cycle de Krebs.^{32,94} Quant au magnésium, il se dégrade par corrosion et se transforme en hydroxyapatite, digéré par les macrophages.^{101,102}

Ce type de stent montre des inconvénients majeurs malgré son design novateur ; il est plus susceptible de fracturer à sur-dilatation à cause de sa matière organique. De plus, l'effondrement de l'échafaudage peut conduire à une thrombose coronarienne tardive.^{103,104} Les filaments plus épais du stent bio-résorbable donnent lieu à un cisaillement plus important, ce qui peut provoquer une activation plaquettaire.⁹⁷ En outre, la durée de disparition complète du

squelette organique (PLLA en particulier) peut se prolonger jusqu'à trois ans,^{97,105} une période longue qui nécessite un traitement DAPT sur un long terme. Le développement de ce stent exige alors une recherche plus élaborée afin d'améliorer les conditions de sécurité.

3. Développement d'un biomatériau, critères de sélection

Les biomatériaux sont utilisés dans la conception des dispositifs médicaux dans le but de couvrir les fonctions biologiques insuffisantes, souvent vitales chez l'homme. Leur capacité à remplacer, réparer et améliorer la régénération tissulaire est recherchée dans le traitement des maladies. Pour qu'un biomatériau puisse servir dans le développement d'un dispositif médical, il doit remplir les conditions et les critères nécessaires pour accomplir cette tâche. Un dispositif cardiovasculaire par exemple, doit présenter une bonne hémocompatibilité, une cinétique de libération du principe actif adaptée et favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales, afin de permettre la revascularisation de la paroi artérielle. Dans le développement d'un revêtement polymère pour stents, on se concentre sur la biocompatibilité et la biodégradabilité du polymère, la non-toxicité de ses produits de dégradation et le comportement cellulaire. On étudie également les propriétés de surface du biopolymère et ses propriétés mécaniques, facteurs très importants dans l'évaluation de la compatibilité du polymère pour cette application. La composition chimique de la surface, la mouillabilité, la topographie, l'élasticité, ou encore la température de transition vitreuse (T_g) sont des critères significatifs, déterminant les propriétés de surface et les propriétés mécaniques.

3.1. Biocompatibilité

La biocompatibilité du matériau naturel ou synthétique utilisé pour construire un dispositif médical permet sa mise en contact avec le système biologique dans le but de servir de support ou remplacer un tissu.¹⁰⁶

Selon D. F. Williams, la biocompatibilité est définie comme suit :¹⁰⁷

« Capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction souhaitée par rapport à une thérapie médicale, sans provoquer d'effets locaux ou systémiques indésirables chez le destinataire ou le bénéficiaire de cette thérapie, mais en générant la réponse cellulaire ou tissulaire bénéfique la plus appropriée à cette situation, et l'optimisation des performances cliniquement pertinentes de cette thérapie. »

Aujourd'hui, les biomatériaux ont de nombreuses et diverses applications dans le domaine de la santé et de l'esthétique, comme par exemple les lentilles de contact, les valves cardiaques synthétiques, les prothèses de hanche, les fils de suture, les prothèses mammaires, les stents endovasculaires, ou encore les prothèses dentaires (figure 16).

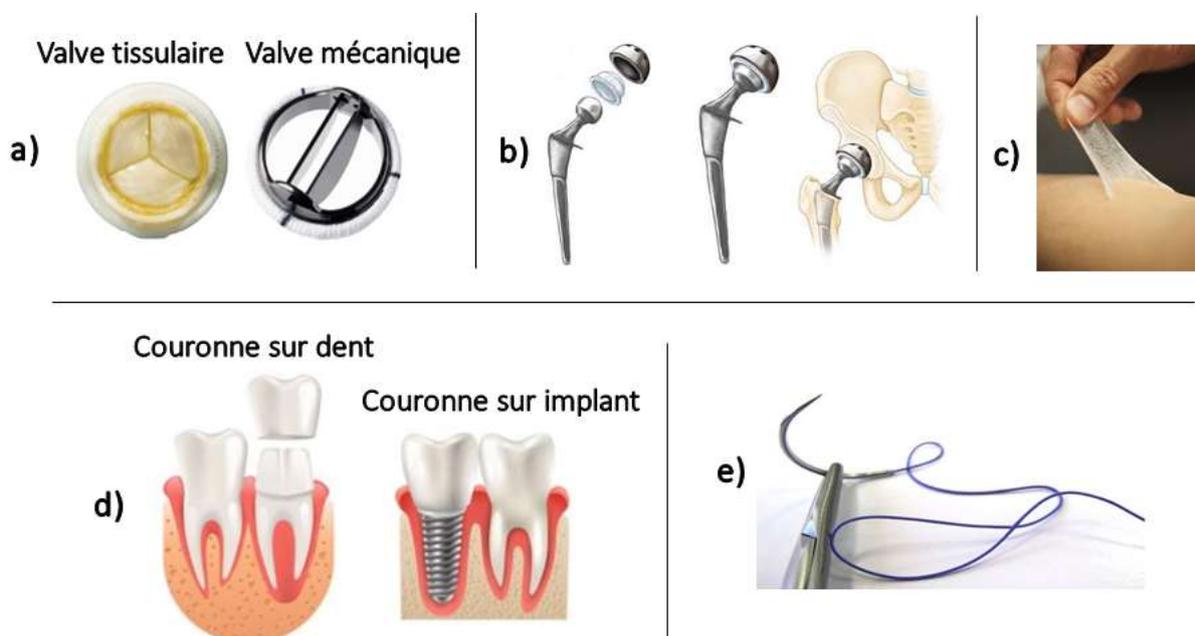


Figure 16 : Utilisation des biomatériaux pour des applications biomédicales
a) Valves cardiaques artificielles,¹⁰⁸ b) Prothèse de hanche,¹⁰⁹ c) Peau artificielle,¹¹⁰
d) Prothèse dentaire,¹¹¹ e) Fil de suture biodégradable¹¹²

Le matériau de base de ces dispositifs peut être métallique (comme l'acier inoxydable, le titane et le platine),¹¹³ céramique (comme l'alumine et la zircone),¹¹⁴ en verre (comme la silice),^{115,116} d'origine animale (comme le collagène),¹¹⁷ ou encore polymère (naturel ou synthétique comme le collagène et le PLA respectivement).^{118,119}

3.2. Propriétés de surface du biomatériau

Etant donné que les réactions biomatériau/milieu physiologique ont lieu la plupart du temps à l'interface et à la surface des biomatériaux, les propriétés de surface portent une importance particulière dans la conception de ces derniers. Chaque application biomédicale peut acquérir une gamme de propriétés qui sont influencées par la nature de la surface. Les propriétés de surface d'un biomatériau sont déterminées en fonction de plusieurs facteurs :

- **Fonctionnalité de la surface (composition chimique)**

La composition chimique de la surface d'un biomatériau est l'un des éléments cruciaux déterminant la biocompatibilité de ce dernier. Différents groupements fonctionnels peuvent montrer différents effets concernant l'adhésion et la prolifération des cellules sur une surface. Selon la littérature, les groupements chimiques de type amine (-NH₂), imine (=NH), hydroxyle (-OH), ester (-COOR) et acide carboxylique (-COOH) ont une influence considérable sur le comportement cellulaire. La présence des groupements -COOH en particulier, semble avoir le plus d'effet sur ce phénomène.¹²⁰

Bisson *et al.* montrent que l'adhésion des CMLs de la vessie est améliorée sur une surface de poly(téréphtalate d'éthylène) (PET), modifiée par le greffage d'acide acrylique (contenant des groupements -COOH).¹²¹ Les résultats des recherches de Tidwell *et al.* montrent un effet similaire sur l'adhésion des cellules endothéliales en présence des groupements acide carboxylique.¹²² Des résultats proches ont été observés par McClary *et al.* concernant l'adhésion et la propagation des fibroblastes en présence des protéines, l'albumine sérique bovine et la fibronectine.¹²³ Cela est expliqué par la favorisation de l'adhésion de la fibronectine sur la surface grâce à l'hydrophilie issue de la présence des groupements acide carboxylique. L'adhésion, la croissance, la migration et la différenciation des cellules sont proportionnelles à l'adsorption de la fibronectine.^{120,123-125}

- **Énergie de surface et mouillabilité de surface**

Lorsque la surface d'un biomatériau entre en contact avec des fluides biologiques, toute activité cellulaire comme l'adsorption protéique et la fixation cellulaire, dépend de l'énergie de surface de cette dernière.^{126,127} La relation entre l'adhésion cellulaire et l'énergie libre de la surface du biomatériau est telle que, en général, une surface de haute énergie de surface peut améliorer l'adhésion et l'étalement des cellules, tandis qu'une surface de faible énergie de surface peut affaiblir les comportements cellulaires. Ce phénomène est observé indépendamment de la présence des protéines.¹²⁸

Au contact du milieu physiologique, la surface du biomatériau est recouverte des protéines sériques et plasmatiques. Cette adhésion protéique se produit en quelques minutes, voire secondes, et joue un rôle sur le comportement cellulaire.^{128,129} L'énergie de surface stimule la mouillabilité de la surface (hydrophilie ou hydrophobie) et est un facteur clé qui conditionne l'adsorption des protéines à la surface et donc le comportement cellulaire.¹³⁰ La mouillabilité d'une surface est déterminée par la mesure de l'angle de contact. Normalement, les surfaces de

mouillabilité modérée favorisent davantage l'adhésion et la croissance cellulaire. Les surfaces dites superhydrophiles (angle de contact inférieur à 5°) et les surfaces dites superhydrophobes (angle de contact supérieur à 150°) ne sont pas convenables pour l'attachement des cellules.¹²⁶

- **Topographie/Rugosité**

La rugosité de la surface joue un rôle important dans l'adhésion des cellules, ainsi que dans leur étalement et propagation. En effet, la rugosité de surface module la réponse biologique des tissus en contact avec l'implant car elle présente une influence directe sur la morphologie et la réponse cellulaires.¹³¹⁻¹³⁴ Des publications démontrent que selon leur expression génique, les cellules cultivées sur des surfaces micro-rugueuses sont davantage stimulées vers la différenciation par rapport à celles qui poussent sur une surface lisse.¹³⁵

Une surface est considérée comme lisse pour une valeur de rugosité de surface (R_a) inférieure à $1\mu\text{m}$, et rugueuse pour une R_a supérieure à $1\mu\text{m}$.¹³⁶ Le comportement cellulaire varie sur des surfaces de différente rugosité selon le type de la cellule. Les recherches de Chung *et al.* montrent que l'augmentation de la rugosité de la surface sur un échantillon de polyuréthane à l'échelle nanométrique favorise l'adhésion et la croissance des HUVECs sur ces surfaces.¹³⁷

3.3. Propriétés mécaniques

Outre les propriétés physicochimiques d'un biomatériau, les propriétés mécaniques sont également d'une grande importance. C'est la réponse d'un matériau à différents niveaux de force qui est déterminée par trois types de déformation : élastique, plastique et viscoélastique. Les cellules peuvent réagir différemment selon les propriétés mécaniques d'un biomatériau.

- **Élasticité/Rigidité**

L'élasticité de surface fait partie des caractéristiques clés d'un biomatériau. Elle représente la résistance d'un matériau à une déformation et est également mentionnée avec des termes comme rigidité, dureté, ou encore flexibilité. Mesurée par le module de Young, l'élasticité affecte la prolifération et la différenciation cellulaires par le biais de différents mécanismes.¹³⁸ Elle influence également la contractilité, la motilité et la propagation des cellules sur la surface de ce substrat.¹³⁹

Le module de Young est une grandeur donnée par le rapport contrainte (σ)/déformation (ϵ), et détermine l'élasticité/dureté d'un matériau. Il est exprimé par une unité de pression, souvent en mégapascal (MPa ou N/mm^2) ou en gigapascal (GPa ou kN/mm^2) et est la pente de la courbe contrainte-déformation (figure 17). Le module de Young est déterminé par un essai de traction ou de compression. Plus le module de Young d'un matériau est élevé, plus il est rigide.

Une autre grandeur importante déterminant les propriétés mécaniques d'un matériau est la résistance à la traction. Il s'agit de la contrainte maximale qu'un matériau peut subir tout en étant étiré, avant d'arriver à la rupture (figure 17). Tout comme le module de Young, elle est exprimée en Pa ou en MPa et détermine la fragilité ou la ductilité d'un matériau.

Discher *et al.* ont démontré que la rigidité d'un substrat oriente la différenciation de la lignée des cellules souches. En effet, ils montrent que des adhérences focales se développent et l'organisation du cytosquelette augmente avec la rigidité de la matrice. Les matrices plus rigides produisent également des cellules plus rigides et plus tendues.^{140,141}

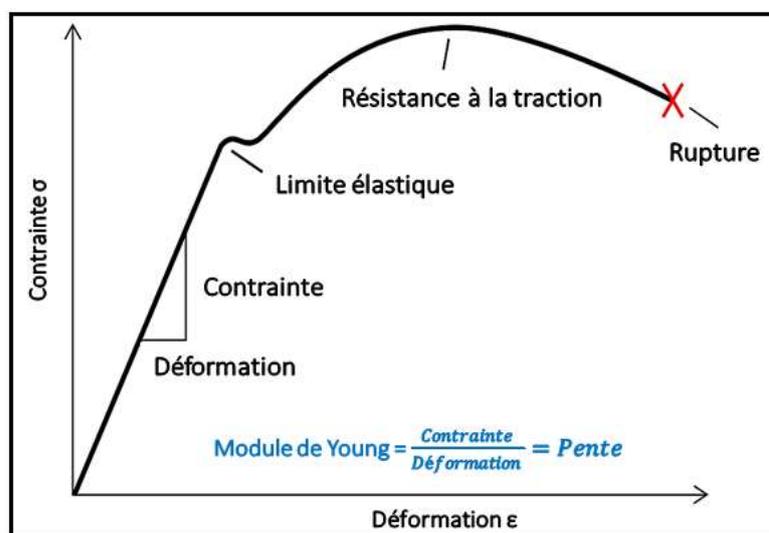


Figure 17 : Courbe de contrainte-déformation d'un matériau

Le module de Young, ainsi que la résistance à la traction du matériau peuvent être déterminés grâce à cette courbe.¹⁴²

3.4. Adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est définie comme la capacité d'une cellule à s'attacher à une autre cellule, à la matrice extracellulaire ou à un substrat. Cette étape est d'une importance primordiale pour la survie, la communication, et la régulation cellulaire. L'adhésion s'effectue par l'intermédiaire des intégrines qui sont des protéines transmembranaires des cellules. Après

avoir formé des points d'attache à une surface, la cellule se renforce en accumulant des intégrines à proximité de chacun de ces points d'attache. Celles-ci forment une adhérence focale, agissant comme un lien entre le cytosquelette actinique de la cellule et la surface (figure 18). Une fois les points de contact adhésifs formés, la cellule s'étale sur la surface (*spreading*) et débute alors un cycle cellulaire normal.¹²⁵

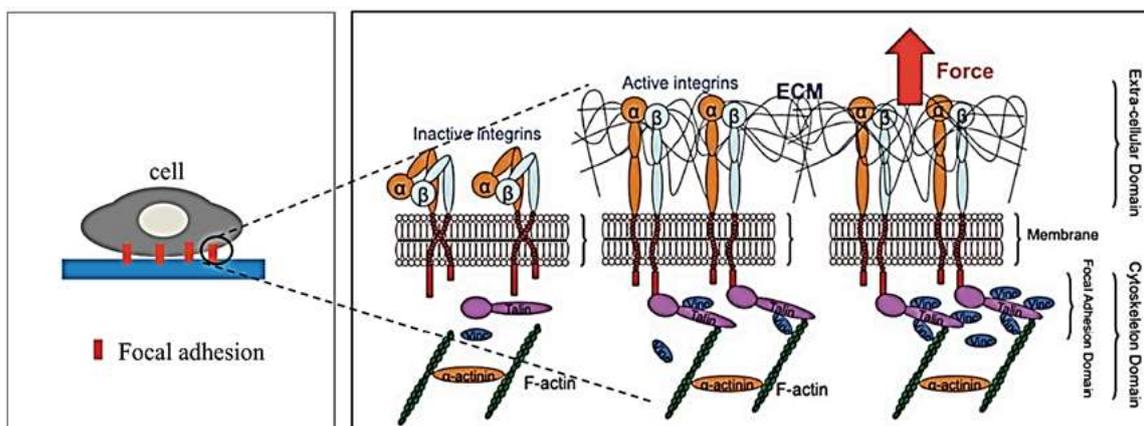


Figure 18 : Représentation schématique de l'adhérence focale d'une cellule
 Cette adhérence se produit grâce à la formation des liens matrice extracellulaire-intégrine-cytosquelette.^{143,144}

Le processus d'adhésion cellulaire *in vitro* se caractérise par trois étapes (tableau 1) : l'attachement de la cellule à son substrat, l'aplatissement et l'étalement du corps cellulaire et l'organisation du squelette d'actine avec la formation de l'adhérence focale entre la cellule et son substrat.

Tableau 1 : Évaluation des étapes d'adhésion cellulaire *in vitro*¹⁴⁴

Phases d'adhésion cellulaire	Phase I	Phase II	Phase III
Adhésion cellulaire			
Transformation de la forme cellulaire	Attachement initial	Aplatissement	Étalement complet et organisation structurale
Intervention d'adhésion cellulaire	Interaction électrostatique	Liaison des intégrines	Adhésion focale
Étapes de l'adhésion	Sédimentation	Attachement cellulaire	Étalement et adhésion stable

* MEC : matrice extracellulaire

Après l'attachement initial, les cellules continuent à s'aplatir et à s'étendre sur le substrat (phase I) ; ensuite, la cellule s'étend au-delà de la zone projetée de la cellule sphérique non étalée (phase II). Le processus d'étalement et la combinaison de l'adhérence continuent avec la réorganisation et la distribution du squelette d'actine autour du bord du corps cellulaire. Les cellules atteignent leur zone de propagation maximale par expansion et la force d'adhésion devient plus importante (phase III).^{143,144} La capacité d'une surface à induire une bonne adhésion cellulaire fait donc partie des critères de sélection d'un biomatériau adéquat pour l'application biomédicale. Les propriétés de surface mentionnées ci-dessus ont une grande influence sur ce critère.

3.5. Adhésion des protéines

L'adhésion des cellules est influencée par plusieurs facteurs dépendants des propriétés de surface du biomatériau. Ces propriétés affectent également l'adhésion des protéines, phénomène très important dans la régulation du comportement cellulaire. En effet, dès sa mise en contact avec le milieu physiologique, la surface du biomatériau est recouverte des protéines sériques et plasmatiques.^{128,129} L'adhésion cellulaire sur la surface du biomatériau se produit donc par l'intermédiaire de la couche de protéines d'adhésion. Les intégrines de la surface cellulaire interagissent avec les protéines adsorbées. Les formes, concentrations et conformations de ces protéines d'adhésion jouent un rôle déterminant dans la réponse cellulaire vis-à-vis du biomatériau. En effet, une réorientation, un changement conformationnel ou un changement de distribution des charges protéiques peut avoir lieu suivant l'adsorption des protéines à la surface, affectant le mécanisme de l'attachement cellulaire.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Les expériences individuelles réalisées avec les protéines dans un tampon peuvent être utilisées pour l'étude des aspects fondamentaux de l'adsorption des protéines tels que les taux d'adsorption ou les changements de conformation et pour étudier les réponses biologiques telles que l'adhésion cellulaire à chaque protéine.

4. Polymères biodégradables

Les polymères biodégradables (PBDs) ont gagné leur place dans le domaine biomédical depuis plusieurs années pour des applications diverses et variées grâce à leurs caractéristiques et propriétés intéressantes. Ils sont utilisés en ingénierie tissulaire, en médecine régénérative ou encore en orthopédie.¹⁴⁸ Outre leur capacité de biocompatibilité, ils se dégradent au cours du

temps en laissant des produits de dégradation non toxiques, ce qui présente un intérêt majeur concernant la fiabilité et la durabilité du traitement médical. La figure 19 montre la classification des PBDs d'origine naturelle et synthétique.

Dans le cas des stents endovasculaires par exemple, le stent métallique recouvert d'un PBD est le type de stent le plus utilisé. Le choix d'un bon PBD est alors crucial en termes de réaction du milieu physiologique, de durée de dégradation et de non-toxicité des produits de dégradation. Le rôle du polymère dans les DESs est également important du point de vue de la libération du principe actif, conçu pour le traitement de la RIS. Il sert dans un premier temps de matrice d'accueil pour l'actif et dans un deuxième temps il régule la cinétique de libération de ce dernier.¹⁴⁹

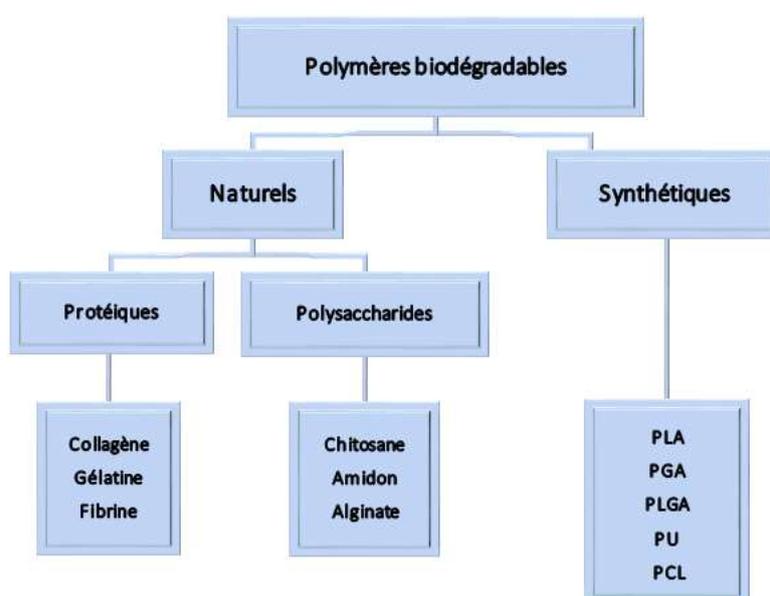


Figure 19 : Classification des PBDs d'origine naturelle et synthétique¹⁵⁰

4.1. Polyuréthane

Les polyuréthanes (PUs) sont utilisés dans le domaine médical pour la construction des dispositifs comme les pacemakers, les cathéters et les cœurs artificiels.¹⁵¹ Ils sont également utilisés en ingénierie tissulaire¹⁵² et en d'autres domaines de la médecine¹⁵³ grâce à leurs bonnes propriétés mécaniques, biocompatibilité et stabilité. Les PUs utilisés dans le domaine médical sont des copolymères composés de deux segments, un segment cristallin appelé le « segment rigide » (issu des groupements aromatiques ou aliphatiques) et un segment caoutchouteux appelé le « segment mou » (constitué des groupements polyols aliphatiques (figure 20)).^{151,154}

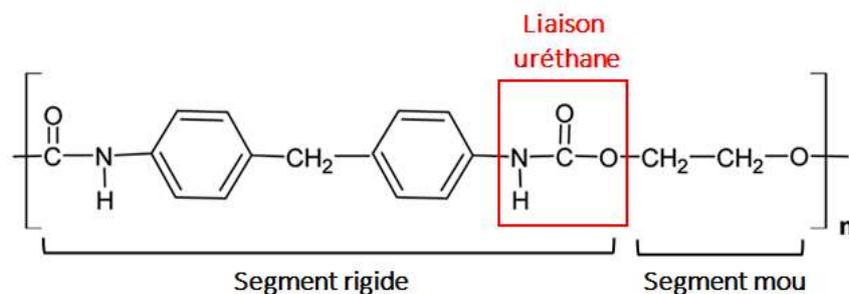


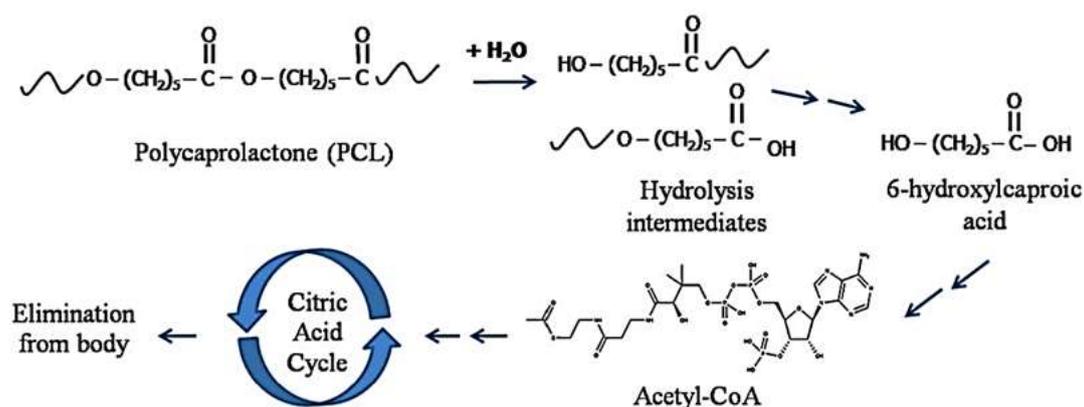
Figure 20 : Structure du PU

Segment rigide : méthylène diphényle isocyanate et segment mou : éthylène glycol.^{154,155}

La biodégradation des PUs a lieu selon deux mécanismes : 1) oxydation biologique, 2) hydrolyse biologique. L'oxydation ou l'hydrolyse peut prédominer dans la dégradation de ce polymère selon la structure du PU (composition des segments rigide et mou).^{154,155}

4.2. Poly(ϵ -caprolactone)

La poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est synthétisée par une voie de polymérisation par ouverture de cycle de la ϵ -caprolactone. Elle se dégrade en deux étapes ; d'abord, par un clivage hydrolytique non-enzymatique des groupements ester, puis par une dégradation intracellulaire quand il est très cristallin et de faible masse moléculaire. La dégradation hydrolytique génère de l'acide 6-hydroxylcaproïque qui se transforme en acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) et entre dans le cycle de Krebs pour être ensuite éliminé (schémas 1 et 2).^{156,157}

Schéma 1 : Poly(ϵ -caprolactone) et sa métabolisation

Biodégradation hydrolytique de la PCL et son élimination par le cycle d'acide citrique (cycle de Krebs).¹⁵⁶

La PCL est un polymère hydrophobe qui présente une faible affinité cellulaire, une durée de dégradation longue allant jusqu'à quatre ans et ne possède pas les propriétés mécaniques correspondant aux critères d'un biomatériau recherché. Des copolymères ou des composites de PCL sont alors développés pour améliorer la biodégradation et l'élasticité de ce dernier.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

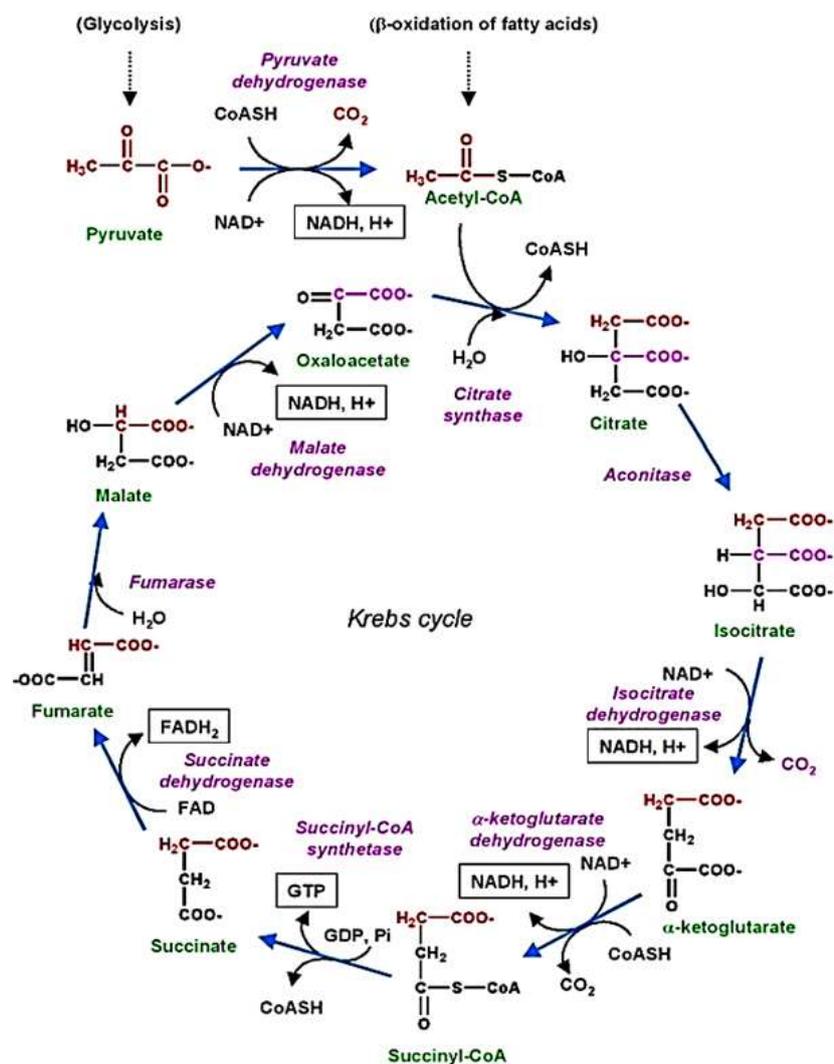


Schéma 2 : Cycle d'acide citrique ou cycle de Krebs¹⁶²

4.3. Poly(acide lactique)

Le poly(acide lactique) est un polyester aliphatique synthétique, occupant une place importante dans le domaine biomédical. Il est utilisé actuellement en tant que matrice pour l'administration de médicaments, comme dispositif de fixation orthopédique, ou encore comme fil de suture biorésorbable.¹⁶³ Les voies de synthèse du PLA à partir de l'acide lactique sont illustrées dans le schéma 3.

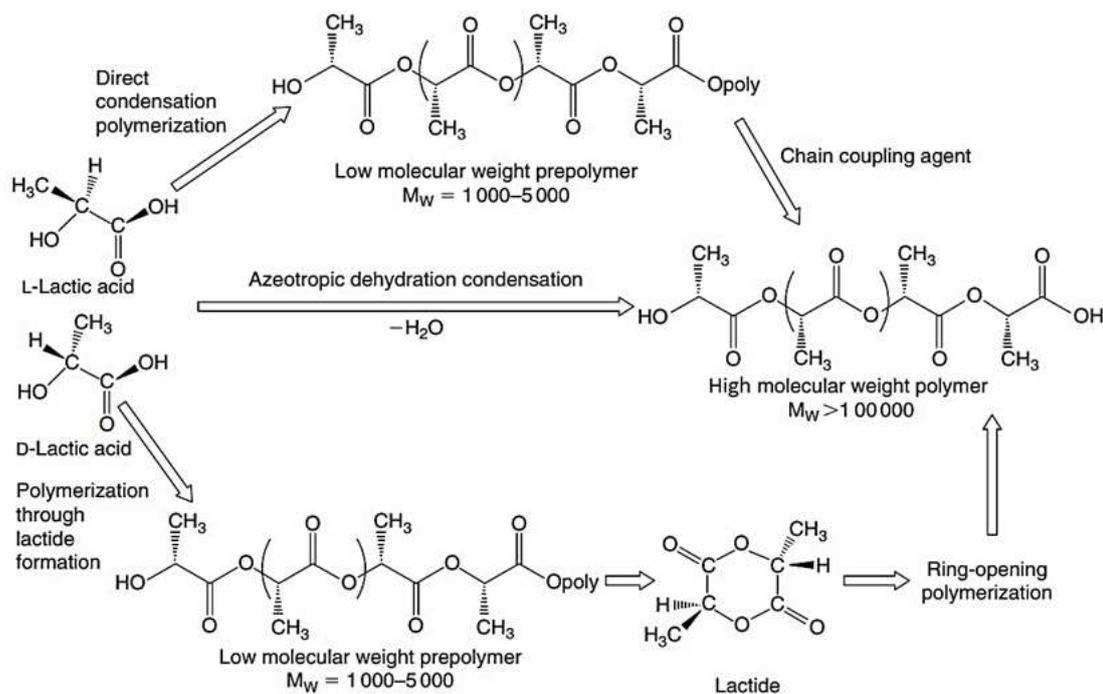


Schéma 3 : Synthèse du PLA de haute masse molaire *via* différentes voies

- 1) Condensation de l'acide lactique ; 2) Condensation déshydratée azéotropique ;
- 3) Polymérisation par formation du lactide.¹⁶⁴

L'acide lactique est une molécule chirale et existe sous deux formes optiquement actives : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique. Le PLA a donc trois stéréo-isomères : le poly(acide L-lactique) (PLLA), poly(acide D-lactique) (PDLA) et le poly(acide L,D-lactique) (PDLLA)¹⁶³. Le PLLA et le PDLA étant isotactiques, optiquement actifs et cristallins, et le PDLLA, atactique, optiquement inactif et amorphe.¹⁶⁵

La biodégradation d'un PBD se réalise en général avec l'action des enzymes. Quant au PLA, il peut se dégrader par hydrolyse non-enzymatique des liaisons ester pour réduire la longueur des chaînes jusqu'à l'acide lactique. Ce dernier est alors métabolisé par le pyruvate *via* le cycle de Krebs.¹⁶⁶

4.4. Poly(acide glycolique)

Le poly(acide glycolique) (PGA) est le plus simple polyester aliphatique et le premier PBD synthétisé par polycondensation de l'acide glycolique ou par polymérisation par ouverture de cycle du glycolide (schéma 4).¹⁶⁷ Structuellement, le PGA est très similaire au PLA, avec l'absence du groupement méthyle latéral, ce qui le rend plus hydrophile et accélère sa cinétique de dégradation.¹⁶⁸

Le principal usage du PGA en médecine est dans la fabrication des fils de suture, grâce à sa dégradation rapide.¹⁶⁹ En effet, le PGA se dégrade à environ 60% pendant les deux premières semaines, à 100% après quatre semaines et son absorption complète s'effectue en quatre à six mois.^{167,170}

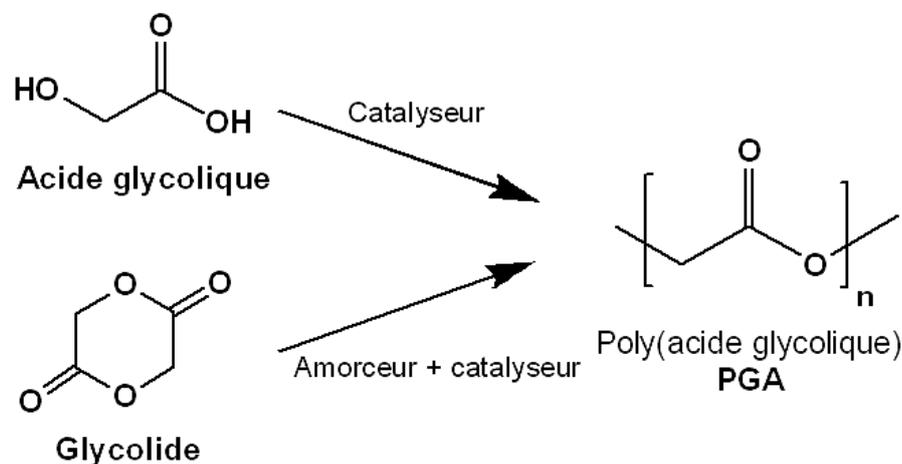


Schéma 4 : Synthèse du PGA

Polycondensation de l'acide glycolique et polymérisation par ouverture de cycle du glycolide.¹⁶⁶

Le PGA se dégrade en deux phases : Phase I : l'eau attaque les groupements ester ; Phase II : les enzymes attaquent les chaînes courtes générées durant la phase I.¹⁷¹ La dégradation rapide de ce polymère due à sa structure fortement hydrophile limite les applications liées au PGA.^{169,172} L'acide glycolique est alors co-polymérisé avec d'autres monomères comme l'acide lactique ou l' ϵ -caprolactone, afin d'ajuster l'hydrophilie de chacun des polymères respectifs.^{48,173}

4.5. Poly(acide lactique-*co*-glycolique)

Le poly(acide lactique-*co*-glycolique) (PLGA) (figure 21) est un copolyester biodégradable, synthétisé à partir des unités monomères du PLA et du PGA. Il est utilisé en ingénierie tissulaire, en tant que revêtement d'implants porteurs de médicaments et dans le développement des DESs.¹⁷⁴ Il a été démontré que les films de PLGA fournissent de bons supports pour la culture de cellules épithéliales du pigment rétinien¹⁷⁵ et accélèrent la cicatrisation osseuse.^{168,176}

Le PLGA est préféré au PLA et PGA car le polymère issu de leur combinaison a une cinétique de dégradation ajustable et des propriétés mécaniques et thermiques intermédiaires comparées à chacun des homopolymères.¹⁶⁸ La cristallinité, le module élastique, la résistance à

la traction et la durée de dégradation du PLGA dépendent du ratio lactique/glycolique adopté lors de la synthèse.¹⁴⁹

La dégradation du PLGA commence par l'hydrolyse des liaisons ester réduisant les chaînes en acide lactique et en acide glycolique, qui sont par la suite éliminés comme décrit précédemment.

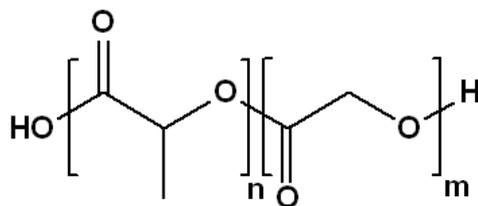


Figure 21 : Structure chimique du PLGA

Le PLGA est constitué des unités de répétition acide lactique (n) et acide glycolique (m).¹⁴⁸

4.6. Poly(acide malique)

Le poly(acide malique) (PMLA) est un autre bio-polyester étudié pour ses propriétés prometteuses dans le domaine biomédical. En effet, le PMLA est non-toxique et non immunogène et présente à la fois une excellente biocompatibilité et biodégradabilité, une très bonne absorption cellulaire et une bonne stabilité dans le sang. De plus, ce dernier possède des groupements latéraux modifiables, ce qui présente un grand intérêt dans le développement des vecteurs de médicaments.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ La fonctionnalisation chimique des groupements acide carboxylique permet de charger le polymère de molécules actives, de protéines spécifiques, d'anticorps et d'autres groupements chimiques fonctionnels.¹⁷⁷ Le PMLA existe sous trois formes : le poly(acide α -malique), le poly(acide β -malique) et le poly(acide γ -malique) (figure 22).¹⁸⁰

La synthèse naturelle du PMLA est réalisée par différents microorganismes comme le *Penicillium cyclopium*,¹⁸¹ le *Physarum polycephalum*¹⁸² et l'*Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*).¹⁸³ Les recherches montrent les *A. pullulans* comme ayant la plus grande activité de biosynthèse du PMLA. Cependant, le précurseur nécessaire à la production du PMLA est le L-malate, quel que soit le microorganisme de biosynthèse. La production du PMLA est alors toujours associée à la biosynthèse du L-malate par les microorganismes.¹⁸⁴ Le L-malate est par ailleurs le produit de dégradation du PMLA, facilement métabolisé *via* le cycle de Krebs.¹⁸⁵

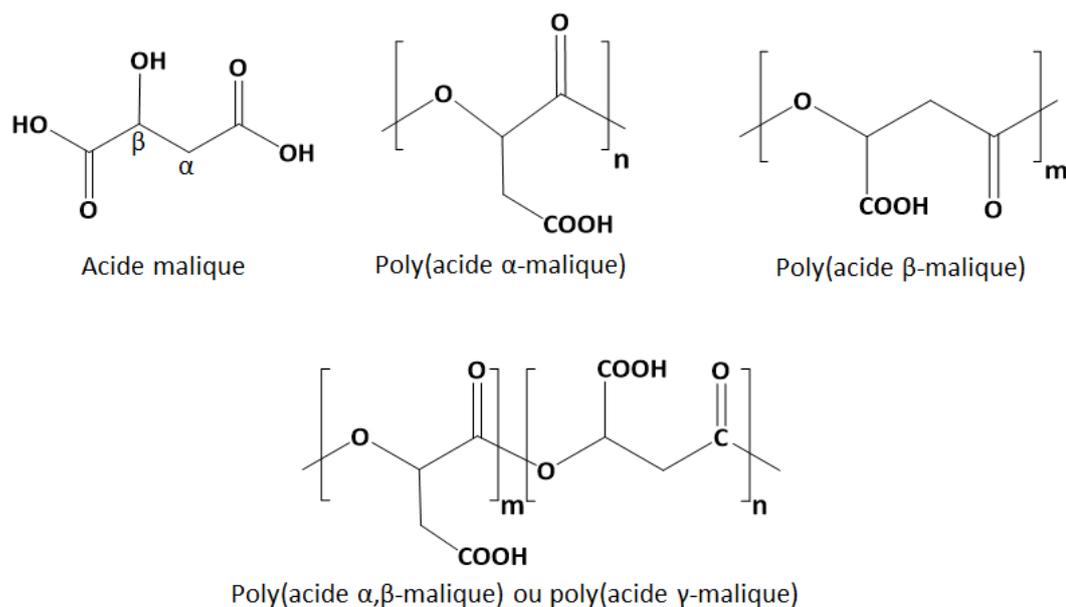


Figure 22 : Structure de l'acide malique et de différentes formes de PMLA ¹⁸⁰

La synthèse chimique de ce polymère est également possible par polycondensation de l'acide L-malique,^{186,187} ou par polymérisation par ouverture de cycle du benzyl- β -malolactonate (MLABn) (schéma 5).¹⁸⁸

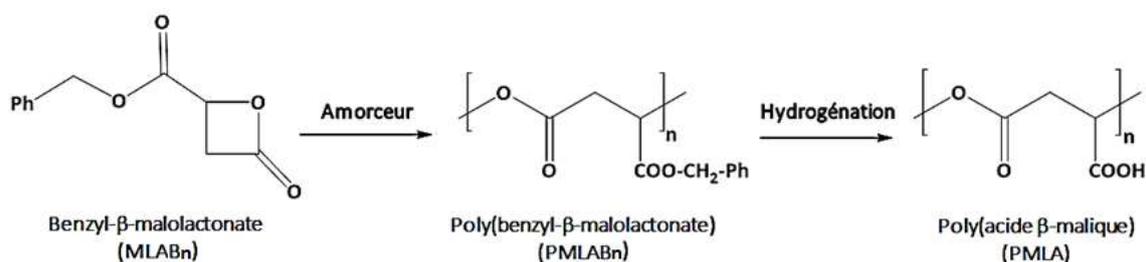


Schéma 5 : Synthèse du PMLA

Polymérisation par ouverture de cycle du monomère benzyl β -malolactonate et déprotection des groupements benzyles ¹⁸⁹

La synthèse par polycondensation est considérée plus facile et rapide, tout en étant écologique grâce à l'absence de solvants organiques. Néanmoins, le PMLA obtenue par cette voie présente très souvent une faible masse molaire et un rendement insuffisant pour une production à l'échelle industrielle. Les recherches de Kajiyama *et al.* ont permis d'améliorer la distribution de masse molaire et le rendement par polycondensation du PMLA en réalisant la réaction à différentes températures et en utilisant différents catalyseurs. Toutefois, malgré les rendements obtenus supérieurs à 90%, la masse molaire maximale obtenue dans ce travail est de l'ordre de 5000 g/mol, ce qui reste faible par rapport à la masse molaire recherchée pour des applications biomédicales.^{186,187}

Quant à la voie par ouverture anionique de cycle, la réaction est réalisée par une attaque nucléophile du carboxylate sur le carbone en β du carbonyle. Mais la présence de deux protons en α de ce même carbonyle peut engendrer une réaction secondaire, un transfert d'hydrogène à l'étape d'amorçage, donnant lieu à plusieurs sous-produits, diminuant le rendement et augmentant la dispersité du polymère (schéma 6).^{189,190}

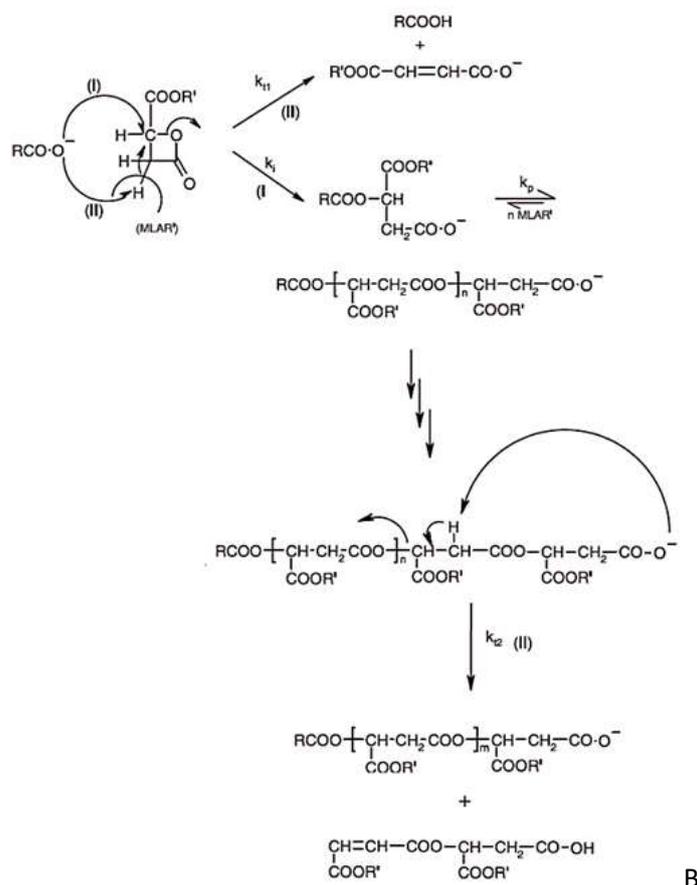


Schéma 6 : Polymérisation anionique par ouverture de cycle de la β -lactone (malolactonate MLAR')

(I) étapes d'initiation et de propagation, (II) étape de terminaison par transfert d'hydrogène¹⁸⁹

Contrairement à la plupart des polymères mentionnés, le PMLA est très hydrosoluble grâce à sa structure hydrophile due à la présence des groupements acide carboxylique. Les recherches de Nagata *et al.* montrent que la dégradation du polymère peut être accélérée avec la température, de telle sorte qu'à 100°C, 98% du PMLA avec une masse moléculaire de 10000 se transforme en acide L-malique en seulement 300 min.¹⁹¹

Différents travaux de recherche ont été effectués afin de diminuer le niveau d'hydrophilie et obtenir un polymère amphiphile tout en conservant les propriétés intéressantes de biocompatibilité et de biodégradabilité. Par exemple, la formation des copolymères bi-blocs ou tri-blocs de PMLA avec le poly(hydroxybutyrate) (PHB) ou le poly(triméthyl carbonate)

(PTMC) est l'une des approches adoptées.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Des copolymères comme le poly(acide malique-*co*-L-lactide) (PML),¹⁹⁵ ainsi que le poly(éthylène glycol-*b*-benzyl malate) PEG₄₂-*b*-PMLABn, ou encore le biotine-PEG₄₂-*b*-PMLABn¹⁹⁶ ont également été synthétisés et étudiés par des groupes de recherche.

Le niveau d'hydrophilie peut également être ajusté avec l'accrochage de différentes molécules hydrophobes sur les groupements acide carboxylique modifiables. Des copolymères de PMLA ont été étudiés en greffant des acides aminés comme la leucine, la valine, l'isoleucine et le tryptophane,¹⁹⁷ ou d'autres groupements comme l'ester éthylique de leucine et l'ester méthylique de phénylalanine.^{198,199} L'accrochage des groupements alkyles comme l'ester isopropylique et l'ester neohexylique a également été étudié.²⁰⁰

4.7. Polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) sont une famille de biopolyesters dégradables de diverses structures chimiques (figure 23), produits par des plantes ou des microorganismes.

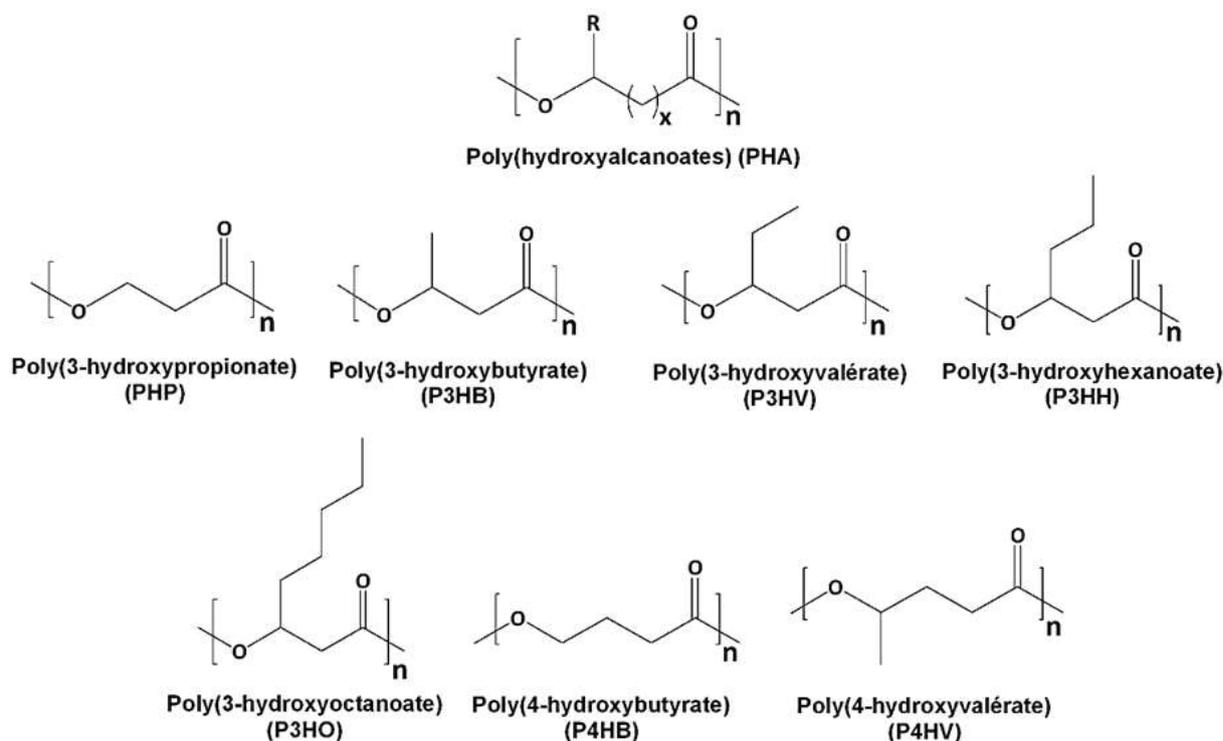


Figure 23 : Structure générale des PHAs et de quelques dérivés^{201,202}

Les rendements de biosynthèse par les plantes sont faibles (< 10% w/w) car un niveau plus élevé de PHA présent dans la plante aurait un effet néfaste pour le développement de cette

dernière.²⁰³ En revanche, les microorganismes procaryotes peuvent accumuler les PHAs jusqu'à 90% (w/w).²⁰⁴ Les microorganismes sont dotés de la capacité de résister au stress environnemental. Par exemple, sous contrainte causée par un taux élevé de carbone et une réduction (ou épuisement) d'azote, de potassium, d'oxygène, de magnésium ou de phosphore, les bactéries manipulent leurs activités métaboliques de telle manière que l'acétyl-CoA est détourné vers la synthèse des PHAs, plutôt que de suivre le cycle de Krebs (schéma 7).²⁰⁵ En effet, les PHAs s'accumulent sous forme de granules dans le cytoplasme bactérien en réponse à une limitation de nutriments inorganiques.²⁰⁶ À ce jour, plus de 90 types de bactéries ont été identifiées en tant que productrices de PHAs sous conditions aérobiques ou anaérobiques.²⁰⁷

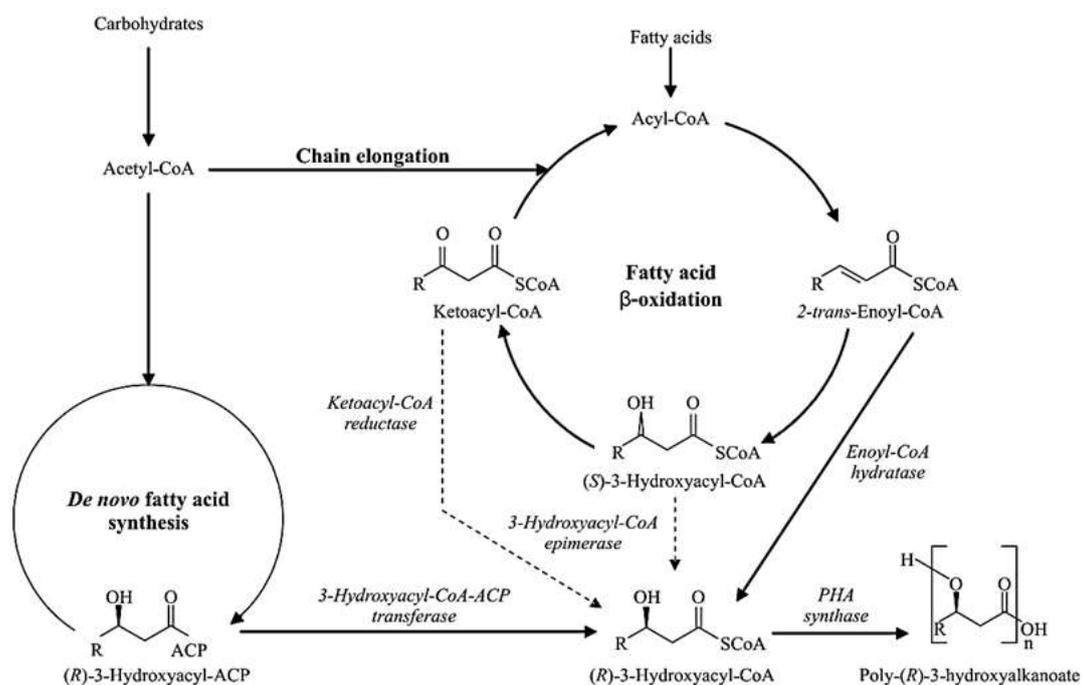


Schéma 7 : Biosynthèse microbienne du PHA d'une longueur de chaîne moyenne ²⁰⁸

Les propriétés intéressantes de ces polymères attirent l'attention dans plusieurs domaines pour diverses applications. Ce sont des polymères thermoplastiques et/ou élastomères, hydrophobes, non-toxiques, piézoélectriques et optiquement actifs. Ils présentent également un degré de polymérisation élevé allant jusqu'à plusieurs millions de Dalton.²⁰⁴ Dans le domaine médical, les PHAs sont utilisés en ingénierie tissulaire, en tant qu'agents de contrôle, comme vecteurs de médicament, comme implants biodégradables ou encore en tant qu'agents anticancéreux.²⁰⁵

Les PHAs se dégradent par compost, par exposition à la terre ou aux sédiments marins. Sous conditions aérobiques, ils se dégradent en dioxyde de carbone, tandis que sous conditions anaérobiques, ils se dégradent en dioxyde de carbone et méthane. Les études ont montré que

85% des PHAs se dégradent en sept semaines.²⁰⁹ La biodégradation des PHAs dépend de plusieurs facteurs comme l'activité microbienne, l'humidité, la température, le pH du milieu, la masse molaire ou encore la cristallinité.²¹⁰

Le tableau 2 rassemble les propriétés thermiques et mécaniques des polymères biodégradables présentés ci-dessus.

Tableau 2 : Propriétés thermiques et mécaniques de quelques PBDs

	T _f (°C)	T _g (°C)	Résistance à la traction (MPa)	Module élastique (GPa)	Elongation à la rupture (%)
PU	57 - 65	-74 - -64	1.8	0.6	62.5
PCL	58 - 63	-65 - -60	20.7 - 34.4	0.21 - 0.34	300 - 500
L-PLA	170 - 200	55 - 65	55.2 - 82.7	2.4 - 4.2	5 - 10
DL-PLA	Am.*	50 - 60	27.6 - 41.1	1.4 - 2.8	3 - 10
PGA	220 - 233	35 - 45	> 68.9	> 6.9	15 - 20
PLGA (50:50)	Am.	45 - 55	41.4 - 55.2	1.4 - 2.8	3 - 10
PHB	168 - 182	5 - 15	40 - 45	3.5 - 4	5 - 8

Am : Amorphe, pas de température de fusion.*

5. Systèmes de libération de principes actifs

Les systèmes de libération ont pour but de faire parvenir un médicament le plus efficacement possible à l'endroit où il est nécessaire. Il existe trois formes de libération : libération brutale, pulsatile et contrôlée (figure 24).

5.1. Libération brutale

C'est la libération très rapide et explosive du médicament peu de temps après son arrivée dans le corps. Dans certains cas, ce type de libération est favorable, comme par exemple pour les traitements dermatiques, où la libération d'une forte dose de médicament est préférable.²¹¹ Toutefois, très souvent, ce mode de libération est considéré désavantageux, pouvant générer de la toxicité liée à la dose de l'actif libéré. Dans la majorité des cas, la libération brutale est indésirable, car elle s'avère imprévisible et incontrôlable.²¹²

5.2. Libération pulsatile

C'est une libération transitoire et rapide d'une quantité de médicament après un certain temps de latence (hors libération) prédéterminé. Les techniques de cette libération peuvent être déterminées selon la physiologie de la maladie du patient et les propriétés du médicament utilisé. Elle est en général utilisée lorsqu'on n'exige pas une libération constante.^{213,214} La plupart des systèmes pulsatiles se comportent comme un réservoir de médicament, entouré d'une barrière qui peut disparaître par érosion, par dissolution ou par rupture, libérant le médicament enfermé.^{215,216} Les gélules de médicaments ou de vitamines sont un bon exemple pour ce type de libération. La libération est alors contrôlée, mais pas constante.

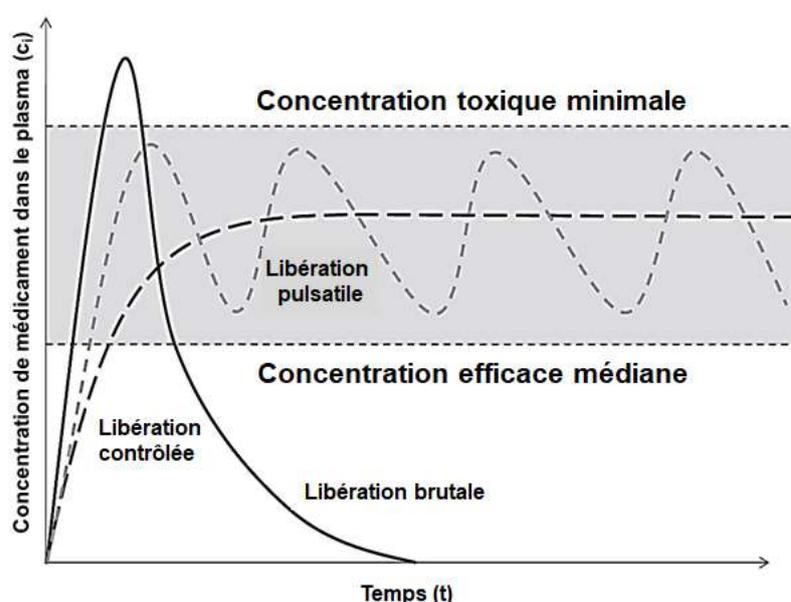


Figure 24 : Différents types de libération de principes actifs

Illustration de l'effet de la libération brutale, contrôlée et pulsatile par rapport à la concentration efficace et la concentration toxique ²¹⁷

5.3. Libération contrôlée

La libération contrôlée permet de maintenir une dose adéquate et constante de médicament dans la zone ciblée pour une durée prolongée. Elle permet également de réduire la dose de médicament nécessaire pour obtenir des résultats similaires chez le patient.^{218,219} C'est donc le cas idéal de libération sur une longue période, notamment durant la période de guérison suivant la pose de stent.

Il est possible de développer un système de libération contrôlée en incorporant le médicament dans une matrice d'accueil (polymère, nanoparticules, hydrogel...). Le revêtement

bioactif des stents (polymère/principe actif) est donc conçu afin de permettre une libération contrôlée de l'actif dans le but d'améliorer les conditions de revascularisation de la paroi artérielle.

6. État de l'art

6.1. Le poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA)

L'objectif de notre projet est de développer un polymère biodégradable comme revêtement de stents métalliques. Comme mentionné précédemment, plusieurs polymères biodégradables sont déjà utilisés pour cette application. Ce sont très souvent des polyesters qui se dégradent au cours du temps au contact avec le milieu physiologique.

Nous présentons un nouveau polyester biodégradable qui montre des propriétés très intéressantes en tant que potentiel revêtement de stents. Le poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA) (figure 25) est un polyester biocompatible et biodégradable aux propriétés prometteuses.

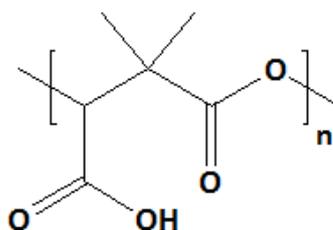


Figure 25: Représentation de la structure du poly(acide [R,S]-3,3-diméthyl malique) PDMMLA

La synthèse des dérivés de PDMMLA est réalisée en incorporant différentes unités monomères lors de l'étape de la polymérisation. Ces monomères sont également développés en laboratoire suivant une voie de synthèse multi-étapes, à partir d'un produit de départ commercial. L'utilisation des β -lactones monomères obtenues permet de réaliser la synthèse à façon des copolymères amphiphiles de PDMMLA avec différents niveaux d'hydrophilie. Le groupement ester hexylique (-COOHex) du monomère 4-hexyloxy-carbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone hexylique) [7] apporte au polymère le caractère hydrophobe et le groupement ester benzylique (-COOBn) du monomère 4-benzyloxy-carbonyl-3,3-diméthyl-oxétanone (β -lactone benzylique) [6] apporte le caractère hydrophile, après une étape de déprotection qui génère l'acide carboxylique (-COOH).

6.2. β -lactones α,α,β -tri-substitués

Les unités monomères des dérivées de PDMMLA sont des β -lactones tri-substituées avec différents groupements qui sont incorporés dans leur structure lors de leur synthèse. Ainsi, l'utilisation d'une quantité calculée de chaque monomère permet d'obtenir un copolymère avec les pourcentages souhaités des groupements latéraux. La préparation de ces β -lactones est réalisée en cinq étapes à partir du produit de départ commercial, le 2-oxalpropionate de diéthyle (schéma 8).

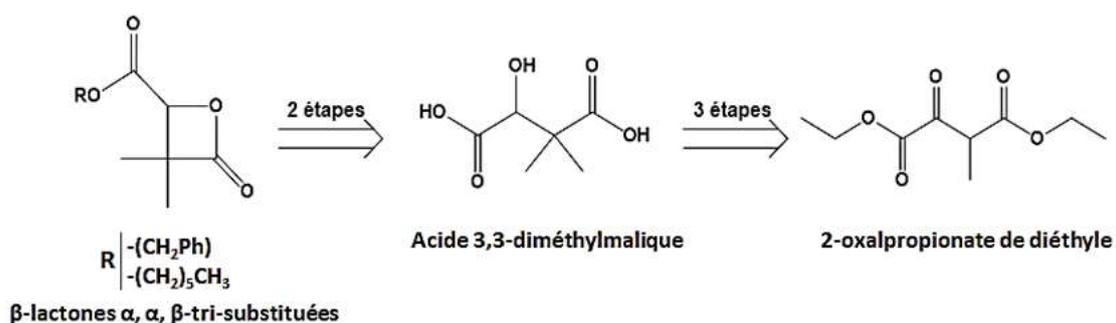


Schéma 8 : Rétrosynthèse des β -lactones α,α,β -tri-substitués

6.3. Synthèse des β -lactones α,α,β -tri-substitués

- Méthylation

La première étape de cette synthèse consiste à faire une méthylation du produit de départ en substituant le proton de la position 2 par un groupement méthyle (schéma 9). Ainsi, le produit 2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle [1] est obtenu. Les étapes détaillées de synthèse des monomères sont publiées et disponibles dans la littérature.²²⁰⁻²²²

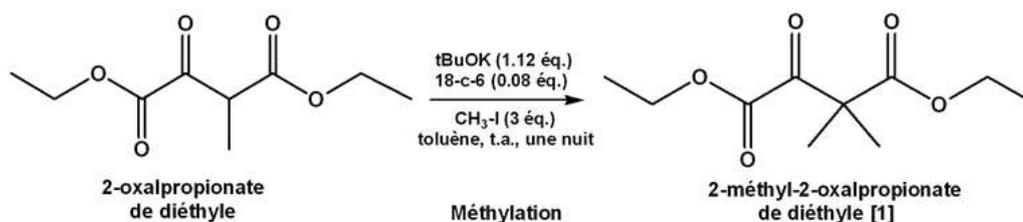


Schéma 9 : Méthylation du 2-oxalpropionate de diéthyle

- **Réduction**

Cette étape permet de réduire la fonction oxal en un groupement alcool et d'obtenir le produit 3,3-diméthylmalate de diéthyle [2] (schéma 10).

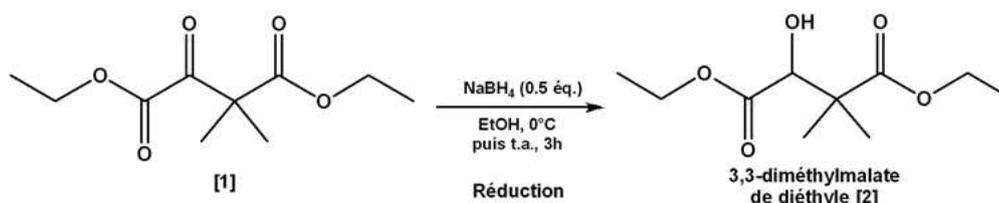


Schéma 10 : Réduction de la fonction oxal en alcool en présence du NaBH_4

- **Hydrolyse basique**

Le produit intermédiaire, l'acide 3,3-diméthylmalique [3] est obtenu par l'hydrolyse basique des deux groupements ester éthylique du produit [2] en acide (schéma 11). Le composé [3] est un diacide à partir duquel sont synthétisées les β -lactones finales.

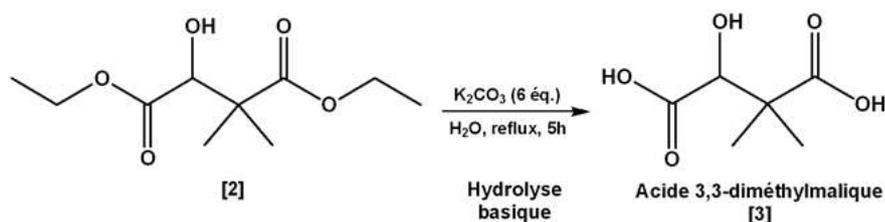


Schéma 11 : Hydrolyse basique des groupements ester éthyliques du produit [2] et obtention du diacide [3]

- **Monoestérification du diacide**

À cette étape de la synthèse, les différents groupements apportant les différentes propriétés aux polymères sont introduits dans la structure des monomères. L'utilisation de l'alcool benzylique permet d'obtenir l'acide 2,2-diméthyl-3-benzyloxycarbonyl-3-hydroxypropanoïque (monoester benzylique) [4]. De la même manière est obtenu l'acide 2,2-diméthyl-3-hexyloxycarbonyl-3-hydroxypropanoïque (monoester hexylique) [5] en utilisant l'alcool hexylique (schéma 12).

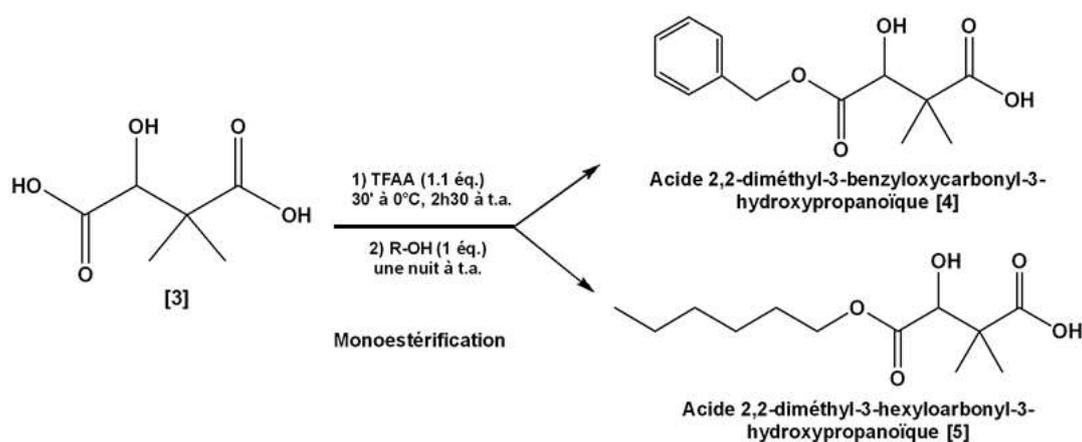
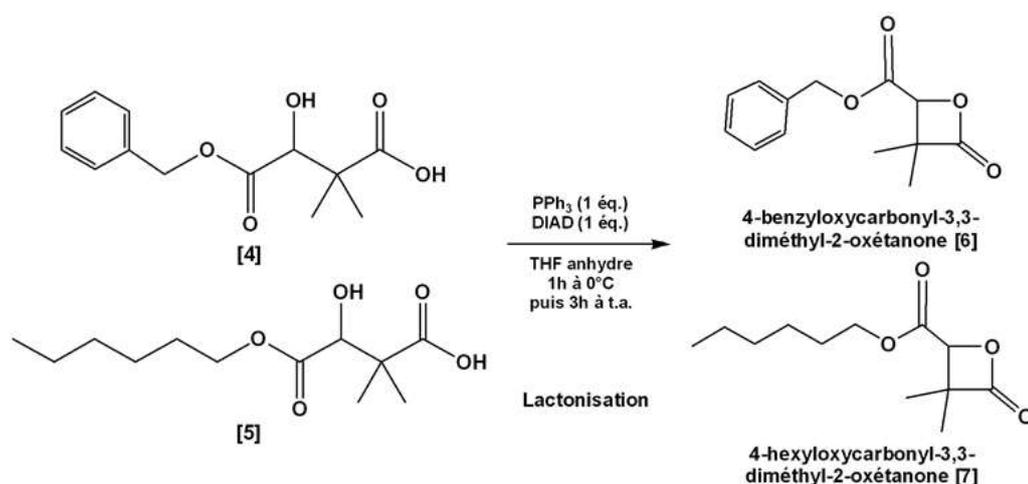


Schéma 12 : Monoestérification du diacide avec deux alcools différents

• Lactonisation des monoesters

Les β -lactones α,α,β -tri-substituées sont obtenues par la lactonisation des monoesters, suivant une réaction de Mitsunobu. Dans cette étape est réalisée la cyclisation du monoester, en présence du triphénylphosphine (PPh_3) et du diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (schéma 13). Les monomères 4-benzyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (lactone benzylique) [6] et 4-hexyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (lactone hexylique) [7] sont alors obtenus à partir des produits [4] et [5] respectivement.

Schéma 13 : Lactonisation des monoesters *via* la réaction de Mitsunobu et obtention des lactones benzylique [6] et hexylique [7]

6.4. Dérivés de PDMMLA

Les β -lactones α,α,β -tri-substitués sont des dérivés des malolactonates β -substitués, utilisés dans la préparation des dérivés de PMLA avec cette fois deux groupements méthyles en α du groupement carbonyle, qui éliminent le risque des réactions secondaires, soit le transfert d'hydrogène évoqué précédemment. L'utilisation de ces β -lactones tri-substitués permet donc d'obtenir un polyester, dérivé du PMLA avec une structure très similaire à celle de ce dernier. En revanche, la présence de deux groupements méthyles en β de la fonction ester augmente le caractère hydrophobe du PDMMLA comparé au PMLA qui ne comporte pas de méthyle en cette position.

L'homopolymère PDMMLA-H comporte des groupements $-\text{COOH}$ comme chaînes latérales. Il est synthétisé à partir de la β -lactone benzylique et est obtenu après l'hydrogénolyse des groupements benzylique en acide carboxylique. Bien que la fonction méthyle en β de l'ester augmente l'hydrophobie du polymère, le PDMMLA-H reste un polyester hydrophile et se dégrade rapidement en milieu aqueux. Il est donc nécessaire de modifier la structure du polymère afin d'obtenir un polyester plus hydrophobe et pallier à ce problème de dégradation rapide. Les groupements ester hexylique sont alors intégrés sur la chaîne latérale du polymère tout en conservant la structure de la chaîne principale. Ces groupements sont introduits dans la structure de la β -lactone monomère lors de sa synthèse et sont conservés sur le polymère après polymérisation.

• Polymérisation des β -lactones

Les copolymères benzyle/hexyle (Bn/Hex) de PDMMLA sont obtenus en utilisant les β -lactones hexylique et benzylique dans la synthèse du polymère. La polymérisation des β -lactones est réalisée *via* une polymérisation anionique par ouverture de cycle en présence de l'amorceur benzoate de tétraéthylammonium ($\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCO}_2^-$) en quantité catalytique (schéma 14).

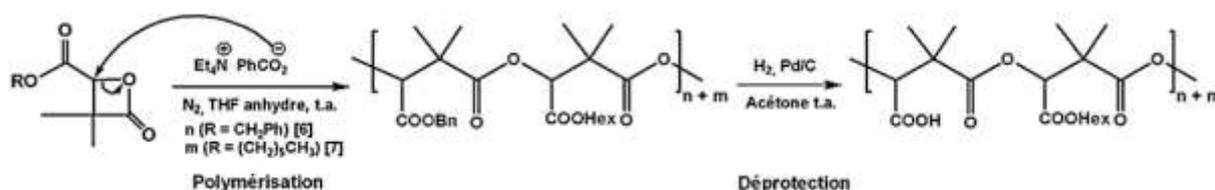


Schéma 14 : Polymérisation par ouverture de cycle des β -lactones

Les monomères utilisés en différentes proportions permettent d'obtenir des copolymères de PDMMLA avec différents niveaux d'hydrophilie.

L'étape d'amorçage commence par l'attaque de l'amorceur sur le carbone en β du carbonyle sur la lactone et donne lieu à une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 en ouvrant le cycle. Les centres actifs carboxylates formés continuent l'attaque nucléophile sur les autres unités monomères et favorisent l'étape de propagation. La polymérisation des β -lactones est contrôlée et suivie par la spectroscopie infrarouge (IR) en observant la disparition progressive de la bande de la lactone à 1841 cm^{-1} (figure 25).

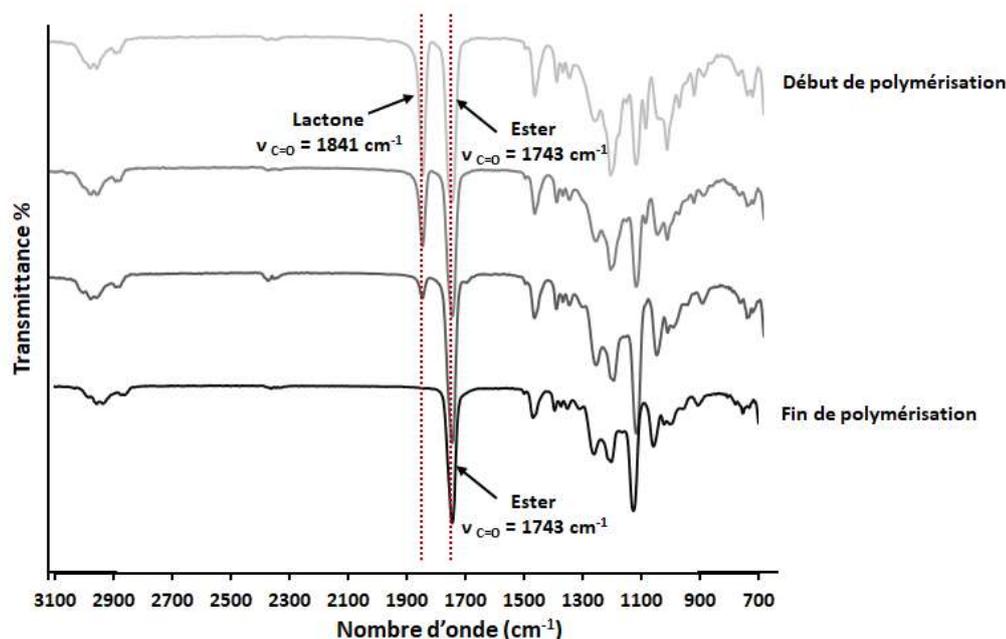


Figure 25 : Suivi de la polymérisation des β -lactones en PDMMLA par FTIR

La disparition totale de la bande de la lactone à 1841 cm^{-1} indique la fin de la polymérisation.

Une fois la polymérisation terminée, la réaction est stoppée par l'ajout d'une goutte d'acide acétique et le polymère obtenu est purifié par précipitation dans l'éthanol. La caractérisation du polymère par RMN permet de confirmer le pourcentage de chaque lactone présente dans la chaîne polymérique. Ceci est réalisé avec le calcul du rapport d'intégration des pics correspondant aux groupements $-\text{CH}_2$ benzylique à 5.20 ppm et $-\text{CH}_2$ hexylique à 4.15 ppm (figure 26).

Les polymères finaux souhaités sont obtenus après une hydrogénéolyse des groupements benzyles en présence de palladium sur charbon. Cette déprotection est confirmée par RMN ^1H en observant la disparition des pics correspondant au groupement $-\text{CH}_2$ et au cycle aromatique du benzyle.

La présence des groupements ester hexylique et acide carboxylique permet d'obtenir un copolymère de PDMMLA amphiphile avec une balance hydrophile/hydrophobe modulable qui

joue un rôle important sur la cinétique de dégradation du polymère, ainsi que ses propriétés physicochimiques et le comportement des cellules vis-à-vis du polymère. De plus, la variation du ratio monomère/amorceur permet de synthétiser des polymères de PDMMLA de différentes masses molaires.

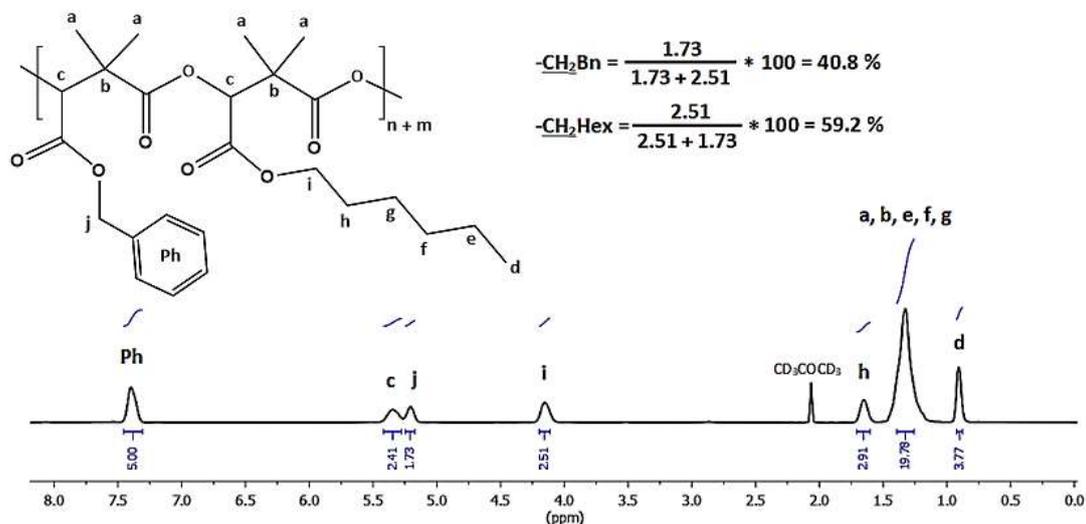


Figure 26 : Caractérisation par RMN ^1H du copolymère de PDMMLA

Ici le copolymère avec 40% de benzyle et 60% d'hexyle (PDMMLA 40/60) est présenté.

La différence majeure du PDMMLA par rapport aux polymères biodégradables mentionnés est la présence des groupements acide carboxylique fonctionnalisables sur sa chaîne latérale. Ces groupements permettent de réaliser non seulement la modulation du niveau d'hydrophilie du polymère, mais également la modification chimique de sa structure *via* un greffage covalent de différentes molécules, comme les médicaments actifs.

• Précédentes études

Les recherches précédentes de ce projet ont été réalisées sur les différentes surfaces de PDMMLA avec différents niveaux d'hydrophilie, leurs propriétés physicochimiques et la réponse cellulaire *in vitro*.

Les copolymères étudiés lors de ces travaux étaient les suivants :

- Le copolymère PDMMLAH_{10-co}-Hex₉₀ (PDMMLA 10/90) [P5], avec 10% de groupements -COOH et 90% de groupements -COOHex (10% d'hydrophilie),
- Le copolymère PDMMLAH_{20-co}-Hex₈₀ (PDMMLA 20/80) [P6], avec 20% de groupements -COOH et 80% de groupements -COOHex (20% d'hydrophilie),

- Le copolymère PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀ (PDMMLA 30/70) [P7], avec 30% de groupements -COOH et 70% de groupements -COOHex (30% d'hydrophilie),

Les homopolymères étudiés étaient les suivants :

- L'homopolymère hydrophobe hexylique PDMMLA-Hex (0/100) sans groupements acides,
- L'homopolymère hydrophile chargé ou l'homopolymère acide PDMMLA-H (100/0) [P2] avec 100% de groupements acides,
- Un homopolymère hydrophile neutre PDMMLA-OH (HP-OH), sans groupements acides également.

Dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation des unités monomères, ainsi que des polymères a été mise au point. Les homopolymères et les copolymères obtenus après l'optimisation des voies de synthèse ont alors été étudiés *via* :

- Une étude de surface et des propriétés viscoélastiques,
- Une étude cinétique de dégradation des différents polymères au cours du temps, à différents pH et différentes températures,
- Une étude biologique de comportement cellulaire *in vitro* en présence des cellules endothéliales HUVECs et des monocytes.

Toutes les études ont également été réalisées sur le polymère le plus utilisé actuellement, le PLA, afin de comparer les effets et les résultats.

L'ensemble de ces résultats encourageants montre que les dérivés de PDMMLA présentent de bonnes propriétés physicochimiques, mécaniques et biologiques et un potentiel élevé en tant que biomatériau. Il serait donc possible d'envisager son utilisation pour des applications biomédicales et en particulier comme futur revêtement de stents cardiovasculaires.

Le tableau 3 récapitule les résultats obtenus lors des études comparatives chimiques, physicochimiques et biologiques des dérivés de PDMMLA et du PLA.

Ces études comparatives sur les trois copolymères de PDMMLA montrent qu'un léger changement d'hydrophilie au sein d'un polymère peut modifier considérablement les résultats expérimentaux. Elles permettent également d'arriver à une conclusion sur le choix du meilleur dérivé de PDMMLA pour des applications biomédicales.

Tableau 3 : Étude comparative des propriétés chimiques, physicochimiques et biologiques des copolymères de PDMMLA et du PLA
Points forts (+), points faibles (-)

		PDMMLAs			PLA
		10/90	20/80	30/70	
Fonctionnalisation de la surface			+		-
Mouillabilité		-	+	++	-
Energie de surface		+	+	+	+
Topographie et rugosité		+++	++	+	-
Propriétés thermomécaniques		+	+	+	-
Réponse biologique	Attachement	+++	++	+	-
	Adhérence	-	+	++	-
	Adhésion des HUVECs	+++	++	+	-
	Adhésion des monocytes	-	+	++	-
Dégradation	Cinétique de dégradation	-	+	++	-
	Cytotoxicité des produits de dégradation	+	+	+	+

* Tableau représenté dans le manuscrit de thèse de R. Belibel (2015) ²²³

Dans le cadre de ce projet de thèse et dans la continuité des travaux précédents, les études de surface des dérivés de PDMMLA ont été menées. Une étude de greffage covalent de principe actif sur le PDMMLA, ainsi que sa libération a été également réalisée. Pour finir une étude de comportement cellulaire sur les nouvelles surfaces de PDMMLA a été pratiquée. Ces études sont présentées en détail dans la partie « résultats et discussions ».

Références

- [1] G. A. Mensah, G. A. Roth, V. Fuster, “The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond” *Journal of the American College of Cardiology*. 74 (20), 2529-2532, **2019**.
- [2] J. Torres-Vázquez, M. Kamei, B. M. Weinstein, “Molecular distinction between arteries and veins” *Cell and Tissue Research*. 314 (1), 43–59, **2003**.
- [3] A. Stefanovska, M. Bračić, “Physics of the human cardiovascular system” *Contemp. Phys.* 40 (1), 31–55, **1999**.
- [4] W. W. Muir, “Cardiovascular Physiology” *Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones.*, Section 4, 417-472, **2017**.
- [5] V. Mahadevan, “Anatomy of the heart” *Surgery (United Kingdom)*. 30 (1), 5–8, **2015**.
- [6] R. H. Whitaker, “Anatomy of the heart” *Medicine (United Kingdom)*. 38 (7), 333-335, **2018**.
- [7] M. A. Laflamme, M. M. Sebastian, B. S. Buetow, “Cardiovascular” *Comparative Anatomy and Histology, A Mouse and Human Atlas*, 135–153, **2012**
- [8] J. E. Wagenseil, R. P. Mecham, “Vascular extracellular matrix and arterial mechanics” *Physiological Reviews*. 89, 957-989, **2009**.
- [9] B. A. Brown, H. Williams, S. J. George, “Evidence for the Involvement of Matrix-Degrading Metalloproteinases (MMPs) in Atherosclerosis” *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147, 197-237, **2017**.
- [10] S. Idres, “Exploration des mécanismes de régulation du tonus vasculaire par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques et de leur altérations dans un modèle d’insuffisance cardiaque” *Thesis Manuscript*, **2018**.
- [11] M. J. Chow, R. Turcotte, C. P. Lin, Y. Zhang, “Arterial extracellular matrix: A mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen” *Biophys. J.*, 106 (12), 2684–2692, **2014**.
- [12] M. W. Majesky, X. R. Dong, V. Hoglund, W. M. Mahoney, G. Daum, “The adventitia: A dynamic interface containing resident progenitor cells” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 31, 1530-1539, **2011**.
- [13] H. Chen, Y. Liu, M. N. Slipchenko, X. Zhao, J. X. Cheng, G. S. Kassab, “The layered structure of coronary adventitia under mechanical load,” *Biophys. J.*, 10 (11), 2555–2562, **2011**.
- [14] D. Versari, L. O. Lerman, A. Lerman, “The importance of reendothelialization after arterial injury” *Curr. Pharm. Des.*, 13 (17), 1811–24, **2007**.
- [15] G. K. Hansson, “Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease” *New England Journal of Medicine*. 352, 1685-1695, **2005**.
- [16] T. Teramoto, J. Sasaki, S. Ishibashi, S. Sadatoshi. H. Daida, S. Dohi, G. Egusa, T. Hiro, K. Hirobe, M. Iida, S. Kihara, M. Kinoshita, C. Maruyama, T. Ohta, T. Okamura, S. Yamashita, M. Yokode, K. Yokote, “Executive summary of the japan atherosclerosis society (JAS) guidelines for the diagnosis and prevention of atherosclerotic cardiovascular diseases in Japan-2012 version” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 20 (6), 517-523, **2013**.

- [17] H. Ait-Oufella, E. Maury, B. Guidet, G. Offenstadt, “L’endothélium : un nouvel organe” *Reanimation*, 17 (2), 126–136, **2008**.
- [18] B. Furie, B. C. Furie, “Mechanisms of thrombus formation” *New England Journal of Medicine*. 359 (9), 938-949, **2008**.
- [19] N. Mackman, R. E. Tilley, N. S. Key, “Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27 (8), 1687-1693, **2007**.
- [20] J. I. Weitz, J. W. Eikelboom, “Advances in Thrombosis and Hemostasis: An Introduction to the Compendium” *Circulation Research*. 118 (9), 1337-1339, **2016**.
- [21] S. Goto, “Understanding the Mechanism of Platelet Thrombus Formation under Blood Flow Conditions and the Effect of New Antiplatelet Agents” *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2 (1), 23–32, **2005**.
- [22] A. Zmysłowski, A. Szterk, “Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols” *Lipids in Health and Disease*. 16 (1), 188, **2017**.
- [23] M. Aziz, “Pathogenesis of Atherosclerosis A Review Pathophysiology” *Med. Clin. Rev.* 2 (3), 1–6, **2016**.
- [24] P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson, “Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis” *Nature*. 473 (7347), 317–325, **2011**.
- [25] N. Katakami, “Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 25 (1), 27-39, **2018**.
- [26] E. Falk, “Pathogenesis of Atherosclerosis” *Journal of the American College of Cardiology*. 47 (8 Suppl), 7–12, **2006**.
- [27] J. F. Bentzon, F. Otsuka, R. Virmani, E. Falk, “Mechanisms of plaque formation and rupture” *Circ. Res.* 114 (12), 1852–1866, **2014**.
- [28] P. Poullalié, “Metabolic agents in the contemporary treatment of angina” *Medicographia*. 38 (3), 245–250, **2016**.
- [29] H. Kulathilake, “Improvement of coronary angiography for quantitative coronary analysis by using a computer vision technique” *Thesis Manuscript*. **2017**.
- [30] A. M. Lincoff, J. J. Popma, S. G. Ellis, J. A. Hacker, E. J. Topol, “Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: Clinical, angiographic and therapeutic profile” *J. Am. Coll. Cardiol.* 19 (5), 926–935, **1992**.
- [31] B. A. Bergelson, R. F. Fishman, C. L. Tommaso, “Abrupt vessel closure: Changing importance, management, and consequences” *Am. Heart J.* 134 (3), 362–381, **1997**.
- [32] T. Schmidt, J. Abbott, “Coronary Stents: History, Design, and Construction” *J. Clin. Med.* 7 (6)126, **2018**.
- [33] D. L. Fischman, M. B. Leon, D. S. Baim, R. A. Schatz, M. P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci, M. Nobuyoshi, M. Cleman, R. Heuser, D. Almond, P. S. Teirstein, R. D. Fish, A. Colombo, J. Brinker, J. Moses, A. Shaknovich, J. Hirshfeld, S. Bailey, S. Ellis, R. Rake, S. Goldberg, “A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease” *N. Engl. J. Med.* 331 (8), 496–501, **1994**.

- [34] Y. Yamamoto, D. L. Brown, T. A. Ischinger, A. Arbab-Zadeh, W. F. Penny, “Effect of stent design on reduction of elastic recoil: A comparison via quantitative intravascular ultrasound” *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 47 (2), 251–257, **1999**.
- [35] 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.* 316 (12), 701–706, **1987**.
- [36] J. Iqbal, J. Gunn, P. W. Serruys, “Coronary stents: Historical development, current status and future directions” *British Medical Bulletin*. **2013**.
- [37] C. Tan, R. A. Schatz, “The History of Coronary Stenting” *Interventional Cardiology Clinics*. 5 (3), 271–280, **2016**.
- [38] M. S. Amir Paisal, I. Taib, A. E. Ismail, “Computational Analysis on Stent Geometries in Carotid Artery: A Review” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 165, 012003, **2017**.
- [39] B. Tomberli, A. Mattesini, G. I. Baldereschi, C. Di Mario, “A Brief History of Coronary Artery Stents” *Rev. Esp. Cardiol.* 7 (5), 312–319, **2018**.
- [40] P. W. Serruys, B. H. Strauss, K. J. Beatt, J. J. Goy, P. Vogt, L. Kappenberger, J. Puel, A. F. Rickards, U. Sigwart, B. B. Meier, E. Michel, “Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent” *N. Engl. J. Med.* 324 (1), 13–17, **1991**.
- [41] H. Mori, C. Lutter, K. Yahagi, E. Harari, R. Kutys, D. R. Fowler, E. Ladich, M. Joner, R. Virmani, A. V. Finn, “Pathology of Chronic Total Occlusion in Bare-Metal Versus Drug-Eluting Stents: Implications for Revascularization” *JACC Cardiovasc. Interv.* 10 (4), 367–278, **2017**.
- [42] M. S. Kim, L. S. Dean, “In-Stent Restenosis” *Cardiovascular Therapeutics*. 29 (3), 190–198, **2011**.
- [43] R. A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati, “Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014” *Eur Hear. J.* 36 (47), 3320–3331, **2015**.
- [44] S. O. Marx, H. Totary-Jain, A. R. Marks, “Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis” *Circ. Cardiovasc. Interv.* 4 (1), 104–111, **2011**.
- [45] R. Hoffmann, G. S. Mintz, G. R. Dussailant, J. J. Popma, A. D. Pichard, L. F. Satler, K. M. Kent, J. Griffin, M. B. Leon, “Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study” *Circulation*. 94 (6), 1247–54, **1996**.
- [46] P. K. Shah, “Inflammation, neointimal hyperplasia, and restenosis: As the leukocytes roll, the arteries thicken” *Circulation*. 107 (17), 2175–2177, **2003**.
- [47] H. D. Danenberg, F. G. P. Welt, M. Walker, P. Seifert, G. S. Toegel, E. R. Edelman, “Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits” *Circulation*. 105 (24), 2917–2922, **2002**.
- [48] A. Strohbach R. Busch, “Polymers for Cardiovascular Stent Coatings” *International Journal of Polymer Science*. ID 782653, **2015**.

- [49] T. Simard, B. Hibbert, F. D. Ramirez, M. Froeschl, Y. X. Chen, E. R. O'Brien, "The Evolution of Coronary Stents: A Brief Review" *Canadian Journal of Cardiology*. 30 (1), 35-45, **2014**.
- [50] S. Bangalore, S. Kumar, M. Fusaro, N. Amoroso, M. J. Attubato, F. Feit, D. L. Bhatt, J. Slater, "Short-and long-term outcomes with drug-eluting and bare-metal coronary stents: A mixed-treatment comparison analysis of 117 762 patient-years of follow-up from randomized trials" *Circulation*. 125 (23), 2873–2891, **2012**.
- [51] J. W. Moses, M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Caputo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein, J. L. Jaeger, R. E. Kuntz, "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery" *N. Engl. J. Med.* 349 (14), 1315–23, **2003**.
- [52] G. W. Stone, S. G. Ellis, D. A. Cox, J. Hermiller, C. O'Shaughnessy, J. Mann, T. Tift, C. Mark. B. P. Ronald. J. Greenberg, J. J. Popma, M. E. Russell, "A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease" *N. Engl. J. Med.* 350 (3), 221–31, **2004**.
- [53] E. P. Navarese, M. Kowalewski, D. Kandzari, A. Lansky, B. Górný, L. Kołtowski, R. Waksman, S. Berti, G. Musumeci, U. Limbruno, R. J. Van Der Schaaf, M. Kelm, J. Kubica, H. Suryapranata, "First-generation versus second-generation drug-eluting stents in current clinical practice: Updated evidence from a comprehensive meta-analysis of randomised clinical trials comprising 31 379 patients" *Open Hear.* 1 (1), e000064, **2014**.
- [54] J. M. Lasala, G. W. Stone, K. D. Dawkins, P. W. Serruys, A. Colombo, E. Grube, J. Koglin, S. Ellis, "An overview of the TAXUS® Express®, paclitaxel-eluting stent clinical trial program" *Journal of Interventional Cardiology*. 19 (5), 422-431, **2006**.
- [55] B. A. Weaver, "How Taxol/paclitaxel kills cancer cells" *Molecular Biology of the Cell*. 25 (18), 2677–2681, **2014**.
- [56] W. Tian, M. T. Kuhlmann, J. Pelisek, S. Scobioala, T. H. Quang, L. Hasib, R. Klocke, U. R. Jahn, S. Nikol, "Paclitaxel delivered to adventitia attenuates neointima formation without compromising re-endothelialization after angioplasty in a porcine restenosis model" *J. Endovasc. Ther.* 13 (5), 616–629, **2006**.
- [57] V. G. Ng, C. Mena, C. Pietras, A. J. Lansky, "Local delivery of paclitaxel in the treatment of peripheral arterial disease" *European Journal of Clinical Investigation*. 45 (3), 333–345, **2015**.
- [58] R. C. Alves, R. P. Fernandes, J. O. Eloy, H. R. N. Salgado, M. Chorilli, "Characteristics, Properties and Analytical Methods of Paclitaxel: A Review," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 48 (2), 110–118, **2018**.
- [59] H. Xiao, P. Verdier-Pinard, N. Fernandez-Fuentes, B. Burd, R. Angeletti, A. Fiser, S. B. Horwitz, G. A. Orr, "Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (27), 10166–10173, **2006**.
- [60] J. C. Leung, L. Cassimeris, "Reorganization of paclitaxel-stabilized microtubule arrays at mitotic entry: roles of depolymerizing kinesins and severing proteins" *Cancer Biol. Ther.* 20 (10), 1337–1347, **2019**.
- [61] B. Louage, O. De Wever, W. E. Hennink, B. G. De Geest, "Developments and future clinical outlook of taxane nanomedicines" *Journal of Controlled Release*. 253, 137–152, **2017**.

- [62] C. J. Creel, M. A. Lovich, E. R. Edelman, “Arterial paclitaxel distribution and deposition” *Circ. Res.* 86 (8), 879–884, **2000**.
- [63] M. A. Lovich, C. Creel, K. Hong, C. W. Hwang, E. R. Edelman, “Carrier proteins determine local pharmacokinetics and arterial distribution of paclitaxel” *J. Pharm. Sci.* 90 (9), 1324–1335, **2001**.
- [64] S. K. R. Guduru, P. Arya, “Synthesis and biological evaluation of rapamycin-derived, next generation small molecules” *MedChemComm.* 9 (1), 27-43, **2018**.
- [65] C. M. Rath, J. B. Scaglione, J. D. Kittendorf, D. H. Sherman, “NRPS/PKS hybrid enzymes and their natural products” *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* 1, 453–492, **2010**.
- [66] L. M. Ballou, R. Z. Lin, “Rapamycin and mTOR kinase inhibitors” *J. Chem. Biol.* 1 (1–4), 27–36, **2008**.
- [67] J. Li, S. G. Kim, J. Blenis, “Rapamycin: One drug, many effects,” *Cell Metab.*, 19 (3), 373–379, **2014**.
- [68] E. B. Borders, C. Bivona, P. J. Medina, “Mammalian target of rapamycin: Biological function and target for novel anticancer agents” *American Journal of Health-System Pharmacy.* 67 (24), 2095-2106, **2010**.
- [69] M. Bikkina, J. Koneru, “Long-term effectiveness and safety of sirolimus drug-eluting stents” *Med. Devices Evid. Res.* 4 (1), 117–124, **2011**.
- [70] J. Hasskarl, “Everolimus” *Recent Results in Cancer Research.*, 211, 101–123, **2018**.
- [71] P. J. Houghton, “Everolimus” *Clin. Cancer Res.* 16 (5), 1368–1372, **2010**.
- [72] D. A. Krueger, M. M. Care, K. Holland, K. Agricola, C. Tudor, P. Mangeshkar, K. A. Wilson, A. Byars, T. Sahmoud, D. N. Franz, “Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis” *N. Engl. J. Med.* 363 (19), 1801–1811, **2010**.
- [73] J. Baselga, M. Campone, M. Piccart, H. A. Burris, H. S. Rugo, T. Sahmoud, S. Noguchi, M. Gnant, K. Pritchard, F. Lebrun, J. T. Beck, Y. Ito, D. Yardley, I. Deleu, A. Perez, T. Bachelot, L. Vittori, Z. Xu, P. Mukhopadhyay, D. Lebwohl, G. N. Hortobagyi, “Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer” *N. Engl. J. Med.* 366 (6), 520–529, **2012**.
- [74] J. C. Yao, M. H. Shah, T. Ito, C. L. Bohas, E. M. Wolin, E. Van Cutsem, T. J. Hobday, T. Okusaka, J. Capdevila, E. G. E. De Vries, P. Tomassetti, M. Pavel, S. Hoosen, T. Haas, J. Lincy, D. Lebwohl, K. Öberg, “Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors” *N. Engl. J. Med.* 364 (6), 514–523, **2011**.
- [75] J. Mehilli, G. Richardt, M. Valgimigli, S. Schulz, A. Singh, M. Abdel-Wahab, K. Tiroch, J. Pache, J. Hausleiter, R. A. Byrne, I. Ott, T. Ibrahim, M. Fusaro, M. Seyfarth, K. L. Laugwitz, S. Massberg, A. Kastrati, “Zotarolimus-versus everolimus-eluting stents for unprotected left main coronary artery disease” *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (22), 2075–2082, **2013**.
- [76] P. W. Serruys, S. Silber, S. Garg, R. I. Van Geuns, G. Richardt, P. E. Buszman, H. Kelbæk, A. J. Van Boven, S. H. Hofma, A. Linke, V. Klauss, W. Wijns, C. Macaya, P. Garot, C. DiMario, G. Manoharan, R. Kornowski, T. Ischinger, A. Bartorelli, J. Ronden, M. Bressers, P. Gobbens, M. Negoita, F. Van Leeuwen, S. Windecker, “Comparison of zotarolimus-eluting and everolimus-eluting coronary stents” *N. Engl. J. Med.* 363 (2), 136–146, **2010**.

- [77] S. Brugaletta, F. Burzotta, M. Sabaté, “Zotarolimus for the treatment of coronary artery disease: Pathophysiology, DES design, clinical evaluation and future perspective” *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 10 (6), 1047-1058, **2009**.
- [78] C.-H. Chen, A. J. Kirtane, “Stents, Restenosis, and Stent Thrombosis”, *The Interventional Cardiac Catheterization Handbook, Fourth Edition*. 179-199, **2017**.
- [79] S. Vasaiwala, L. Mauri, “Clinical review of the Resolute ® zotarolimus-eluting stent for the treatment of coronary artery disease” *Interv. Cardiol.* 4 (1), 33–43, **2012**.
- [80] A. Garcia-Touchard, S. E. Burke, J. L. Toner, K. Cromack, R. S. Schwartz, “Zotarolimus-eluting stents reduce experimental coronary artery neointimal hyperplasia after 4 weeks” *Eur. Heart J.* 27 (8), 988–993, **2006**.
- [81] S. J. Baron, S. Mick, P. S. Shekar, L. Mauri, “Advances in coronary revascularization” *Cardiovascular Therapeutics: A Companion to Braunwald’s Heart Disease: Fourth Edition*. Chapter 1, 214-239, **2012**.
- [82] J. S. Kim, M. K. Hong, C. Fan, T. H. Kim, J. M. Shim, S. M. Park, Y. G. Ko, D. Choi, Y. Jang, “Intracoronary thrombus formation after drug-eluting stents implantation: Optical coherence tomographic study” *Am. Heart J.* 159 (2), 278–283, **2010**.
- [83] L. Mauri, D. J. Kereiakes, R. W. Yeh, P. Driscoll-Shempp, D. E. Cutlip, P. Steg, N. Gabriel, L. T. Sharon, E. Braunwald, S. D. Wiviott, D. J. Cohen, D. R. Holmes, M. W. Krucoff, J. D. Hermiller, D. I. Harold L. Simon, D. E. Kandzari, K. N. Garratt, D. P. Lee, T. K. Pow, P. Lee, M. J. Rinaldi, J. M. Massaro, “Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents” *N. Engl. J. Med.* 371(23), 2155–2166, **2014**.
- [84] N. A. Farid, A. Kurihara, S. A. Wrighton, “Review: Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans” *Journal of Clinical Pharmacology*. 50 (2), 126-142, **2010**.
- [85] R. R. Joshi, R. Hossain, A. C. Morton, R. Ecob, H. M. Judge, C. Wales, J. V. Walker, A. Karunakaran, R. F. Storey, “Evolving pattern of platelet P2Y12 inhibition in patients with acute coronary syndromes” *Platelets*. 25 (6), 416–422, **2014**.
- [86] S. J. Park, D. W. Park, Y. H. Kim, S. J. Kang, S. W. Lee, C. W. Lee, K. H. Han, S. W. Park, S. C. Yun, S. G. Lee, S. W. Rha, I. W. Seong, M. H. Jeong, S. H. Hur, N. H. Lee, J. Yoon, J. Y. Yang, B. K. Lee, Y. J. Choi, W. S. Chung, D. S. Lim, S. S. Cheong, K. S. Kim, J. K. Chae, D. Y. Nah, D. S. Jeon, K. B. Seung, J. S. Jang, H. S. Park, K. Lee, “Duration of dual antiplatelet therapy after implantation of drug-eluting stents” *N. Engl. J. Med.* 362 (15), 1374–1382, **2010**.
- [87] C. W. Lee, J. M. Ahn, D. W. Park, S. J. Kang, S. W. Lee, Y. H. Kim, S. W. Park, S. Han, S. G. Lee, I. W. Seong, S. W. Rha, M. H. Jeong, D. S. Lim, J. H. Yoon, S. H. Hur, Y. S. Choi, J. Y. Yang, N. H. Lee, H. S. Kim, B. K. Lee, K. S. Kim, S. U. Lee, J. K. Chae, S. S. Cheong, I. W. Suh, H. S. Park, D. Y. Nah, D. S. Jeon, K. B. Seung, K. Lee, J. S. Jang, S. J. Park, “Optimal duration of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation a randomized, controlled trial” *Circulation*. 126 (3), 304–312, **2014**.
- [88] K. B. Biggs, K. M. Balss, C. A. Maryanoff, “Pore networks and polymer rearrangement on a drug-eluting stent as revealed by correlated confocal Raman and atomic force microscopy” *Langmuir*. 28 (21), 8238–8243, **2012**.

- [89] S. L. Chin-Quee, S.H. Hsu, K. L. Nguyen-Ehrenreich, J. T. Tai, G. M. Abraham, S. D. C. Pacetti, F. N. Yen, K. Gaku. D. Frank D, D. Renu. N. C. Nadine, A. Leslie, “Endothelial cell recovery, acute thrombogenicity, and monocyte adhesion and activation on fluorinated copolymer and phosphorylcholine polymer stent coatings” *Biomaterials*. 31 (4), 648–657, **2010**.
- [90] M. G. Whitbeck, R. J. Applegate, “Second generation drug-eluting stents: A review of the everolimus-eluting platform” *Clinical Medicine Insights: Cardiology*. 7, 115-126, **2013**.
- [91] N. Kukreja, Y. Onuma, P. W. Serruys, “Xience V™ everolimus-eluting coronary stent” *Expert Rev. Med. Devices*. 6 (3), 219–229, **2009**.
- [92] A. E. R. Agustina Rodriguez-Granillo 1, Bibiana Rubilar, Gaston Rodriguez-Granillo, “Advantages and disadvantages of biodegradable platforms in drug eluting stents” *World J. Cardiol*. 3(3), 84–92, **2011**.
- [93] J. Tsung D. J. Burgess, “Biodegradable polymers in drug delivery systems” *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery, Advances in Delivery Science and Technology*, chapter 5, 107-123, **2012**.
- [94] E. Tenekecioglu, C. Bourantas, M. Abdelghani, Y. Zeng, R. C. Silva, H. Tateishi, Y. Sotomi, Y. Onuma, M. Yilmaz, P. W. Serruys, “From drug eluting stents to bioresorbable scaffolds; To new horizons in PCI” *Expert Review of Medical Devices*. 13 (3), 271-286, **2016**.
- [95] E. Maupas, J. Lipiecki, R. Levy, B. Faurie, B. Karsenty, M. E. Moulichon, F. Brunelle, L. Maillard, F. de Poli, T. Lefèvre, “Safety and efficacy outcomes of 3rd generation DES in an all-comer population of patients undergoing PCI: 12-month and 24-month results of the e-Biomatrix French registry,” *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 90 (6), 890–897, **2017**.
- [96] J. J. Wu, J. A. H. Way, L. Kritharides, D. Brieger, “Polymer-free versus durable polymer drug-eluting stents in patients with coronary artery disease: A meta-analysis” *Ann. Med. Surg.* 38 (2018), 13–21, **2019**.
- [97] D. H. Lee, J. M. d. la T. Hernandez, “The newest generation of drug-eluting stents and beyond” *Eur. Cardiol. Rev.* 13 (1), 54–59, **2018**.
- [98] W. Chen, T. C. J. Habraken, W. E. Hennink, R. J. Kok, “Polymer-Free Drug-Eluting Stents: An Overview of Coating Strategies and Comparison with Polymer-Coated Drug-Eluting Stents” *Bioconjugate Chemistry*. 26 (7), 1277-1288, **2015**.
- [99] M. Baquet, D. Jochheim, J. Mehilli, “Polymer-free drug-eluting stents for coronary artery disease” *J. Interv. Cardiol.* 31(3), 330–337, **2018**.
- [100] H. Y. Ang, H. Bulluck, P. Wong, S. S. Venkatraman, Y. Huang, N. Foin, “Bioresorbable stents: Current and upcoming bioresorbable technologies” *International Journal of Cardiology*. 228, 931-939, **2017**.
- [101] J. Gonzalez, R. Q. Hou, E. P. S. Nidadavolu, R. Willumeit-Römer, F. Feyerabend, “Magnesium degradation under physiological conditions – Best practice” *Bioactive Materials*. 3 (2), 174-185, **2018**.
- [102] H. Kitabata, R. Waksman, B. Warnack, “Bioresorbable metal scaffold for cardiovascular application: Current knowledge and future perspectives” *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 15 (2), 109-116, **2014**.

- [103] D. Braun, M. Baquet, S. Massberg, J. Mehilli, J. Hausleiter, “Collapse of a Bioresorbable Novolimus-Eluting Coronary Scaffold” *JACC Cardiovasc. Interv.* 9 (1), e13–e14, **2016**.
- [104] R. J. Ruiz-Salmerón, S. Pereira, D. De Araujo, “Bioresorbable vascular scaffold collapse causes subacute thrombosis,” *Journal of Invasive Cardiology.* 26 (7), e98-e99, **2014**.
- [105] J. Wiebe, H. M. Nef, C. W. Hamm, “Current status of bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease” *Journal of the American College of Cardiology.* 64 (23), 2541–2551, **2014**.
- [106] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, “Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor” *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition.* 25–49, **2013**.
- [107] D. F. Williams, “On the mechanisms of biocompatibility” *Biomaterials.* 29 (20), 2941–2953, **2008**.
- [108] Z. H. Syedain, L. A. Meier, J. M. Reimer, R. T. Tranquillo, “Tubular heart valves from decellularized engineered tissue” *Ann. Biomed. Eng.* 41 (12), 2645–2654, **2013**.
- [109] A. Aherwar, A. K Singh, A. Patnaik, “Current and future biocompatibility aspects of biomaterials for hip prosthesis” *AIMS Bioeng.* 3 (1), 23–43, **2015**.
- [110] Z. W. K. X. Low, Z. Li, C. Owh, P. L. Chee, E. Ye, K. Dan, S. Y. Chan, D. J. Young, X. J. Loh, “Recent innovations in artificial skin” *Biomaterials Science.* 8, 776–797, **2020**.
- [111] H. Ananth, V. Kundapur, H. S. Mohammed, M. Anand, G. S. Amarnath, S. Mankar, “A review on biomaterials in dental implantology” *International Journal of Biomedical Science.* 11 (3), 113-120, **2015**.
- [112] C. C. Chu, “Types and properties of surgical sutures” *Biotextiles As Medical Implants*, chapter 10, 231-273, **2013**.
- [113] R. I. M. Asri, W. S. W. Harun, M. Samykano, N. A. C. Lah, S. A. C. Ghani, F. Tarlochan, M. R. Raza, “Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review” *Materials Science and Engineering C.* 77, 1261-1274, **2017**.
- [114] L. Gremillard, J. Chevalier, “Matériaux céramiques pour les prothèses orthopédiques” *Tech. l’ingénieur.* MED7100v1, **2016**.
- [115] J. S. Fernandes, P. Gentile, R. A. Pires, R. L. Reis, P. V. Hatton, “Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue” *Acta Biomaterialia.* 59, 2–11, **2017**.
- [116] S. Wang, X. Wang, F. G. Draenert, O. Albert, H. C. Schröder, V. Mailänder, G. Mitov, W. E. G. Müller, “Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration” *Bone.* (67), 292–304, **2014**.
- [117] J. Singh, N. Kumar, A. K. Sharma, S. K. Maiti, T. K. Goswami, A. K. Sharma, “Acellular biomaterials of porcine origin for the reconstruction of abdominal wall defects in rabbits” *Trends Biomater. Artif. Organs.* 22(1), 34–44, **2008**.
- [118] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, “Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications” *Materials (Basel).* (3), 1863–1887, **2010**.
- [119] M. Savioli Lopes, A. L. Jardini, R. Maciel Filho, “Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications” *Procedia Engineering.* 42, 1530-1542, **2012**.

- [120] D. Bhattacharyya, H. Xu, R. R. Deshmukh, R. B. Timmons, K. T. Nguyen, “Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 94 (2), 640–648, **2010**.
- [121] I. Bisson, M. Kosinski, S. Ruault, B. Gupta, J. Hilborn, F. Wurm, P. Frey, “Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells” *Biomaterials*. 23 (15) 3149–3158, **2002**.
- [122] C. D. Tidwell, S. I. Ertel, B. D. Ratner, B. J. Tarasevich, S. Atre, D. L. Allara, “Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold” *Langmuir*. 13 (13), 3404–3413, **1997**.
- [123] K. B. McClary, T. Ugarova, D. W. Grainger, “Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self- assembled monolayer films of alkylthiolates on gold” *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (3), 428–439, **2000**.
- [124] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, “Surface chemistry influences implant biocompatibility” *Curr. Top. Med. Chem.* 8 (4), 270–280, **2008**.
- [125] S. L. McArthur, A. G. Shard, “Biomaterials , Surface properties of” *Encycl. Med. Devices Instrumentation*. 342–354, **2006**.
- [126] L. Chen, C. Yan, Z. Zheng, “Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors” *Materials Today*. 21 (1), 38-59, **2018**.
- [127] H. C. Lai, L. F. Zhuang, X. Liu, M. Wieland, Z. Y. Zhang, Z. Y. Zhang, “The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 93 (1), 289–296, **2010**.
- [128] J. M. Schakenraad, H. J. Busscher, “Cell-polymer interactions: The influence of protein adsorption” *Colloids and Surfaces*. 42 (3–4), 331–343, **1989**.
- [129] J. Wei, T. Igarashi, N. Okumori, T. Igarashi, T. Maetani, B. Liu, M. Yoshinari, “Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts” *Biomed. Mater.* 4 (4), 1–7, **2009**.
- [130] J. Comelles, M. Estévez, E. Martínez, J. Samitier, “The role of surface energy of technical polymers in serum protein adsorption and MG-63 cells adhesion” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (1), 44–51, **2010**.
- [131] C. Xu, F. Yang, S. Wang, S. Ramakrishna, “*In vitro* study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 71 (1), 154–161, **2004**.
- [132] Y. Liu, W. Deng, L. Yang, X. Fu, Z. Wang, P. Van Rijn, Q. Zhou, T. Yu, “Biointerface topography mediates the interplay between endothelial cells and monocytes” *RSC Adv.* 10, 13848–13854, **2020**.
- [133] A. Shah, S. Shah, G. Mani, J. Wenke, M. Agrawal, “Endothelial cell behaviour on gas-plasma-treated PLA surfaces: The roles of surface chemistry and roughness” *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (4), 301–312, **2011**.
- [134] O. Andrukhov, R. Huber, B. Shi, S. Berner, X. Rausch-Fan, A. Moritz, N. D. Spencer, A. Schedle, “Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness” *Dent. Mater.* 32 (11), 1374–1384, **2016**.

- [135] H.-I. Chang, Y. Wang, “Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds” in *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. 569–588, **2015**.
- [136] D. Yamashita, M. Machigashira, M. Miyamoto, H. Takeuchi, K. Noguchi, Y. Izumi, S. Ban, “Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia” *Dent. Mater. J.* 28 (4), 461–470, **2009**.
- [137] 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 (25), 4655–4661, **2003**.
- [138] A. Dolcimascolo, G. Calabrese, S. Conoci, R. Parenti, “Innovative Biomaterials for Tissue Engineering” *Biomater. Tissue Reconstr. or Regen.* 1–18, **2019**.
- [139] X. Q. Brown, K. Ookawa, J. Y. Wong, “Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: Interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response” *Biomaterials*. 26 (16), 3123–3129, **2005**.
- [140] D. E. Discher, P. Janmey, Y. L. Wang, “Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate” *Science*. 310 (5751), 1139–1143, **2005**.
- [141] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, “Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification” *Cell*. 124 (4), 677–689, **2006**.
- [142] H. Lim, S. W. Hoag, “Plasticizer effects on physical-mechanical properties of solvent cast Soluplus® films” *AAPS PharmSciTech*. 14 (3), 903–910, **2013**.
- [143] P. Honarmandi, H. Lee, M. J. Lang, R. D. Kamm, “A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment” *Lab Chip*. 11(4), 684–694, **2011**.
- [144] A. A. Khalili, M. R. Ahmad, “A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications” *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (8), 18149–18184, **2015**.
- [145] C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. I. Leavesley, M. J. Percy, “Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review” *Tissue Engineering*. 11 (1-2), 1–18, **2005**.
- [146] D. Yang, X. Lü, Y. Hong, T. Xi, D. Zhang, “The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials” *Biomaterials*. 34 (23), 5747–5758, **2013**.
- [147] T. A. Horbett, “Adsorbed Proteins on Biomaterials” *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. 645–660, **2013**.
- [148] I. C. C. de Moraes Porto, “Polymer Biocompatibility” in *Polymerization*. chapter 3, 47–62, **2012**.
- [149] K. D. Rizas, J. Mehilli, “Stent polymers: Do they make a difference?” *Circ. Cardiovasc. Interv.* 9 (6), e002943, **2016**.
- [150] H. Patel, M. Bonde, G. Srinivasan, “Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering” *Trends Biomater. Artif. Organs*. 25 (1), 20–29, **2011**.
- [151] D. E. Heath, S. L. Cooper, “Polyurethanes” *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*. chapter I.2.2.A, 1–4, **2013**.

- [152] S. Grad, L. Kupcsik, K. Gorna, S. Gogolewski, M. Alini, “The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: Potential and limitations” *Biomaterials*. 24 (28), 5163–5171, **2003**.
- [153] S. A. Guelcher, “Biodegradable polyurethanes: Synthesis and applications in regenerative medicine” *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 14 (1), 3-17, **2008**.
- [154] E. M. Christenson, J. M. Anderson, A. Hiltner, “Biodegradation mechanisms of polyurethane elastomers?” *Corros. Eng. Sci. Technol.* 42 (4), 312–323, **2007**.
- [155] N. Mahajan, P. Gupta, “New insights into the microbial degradation of polyurethanes” *RSC Advances*. 5 (52), 41839-41354, **2015**.
- [156] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century” *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 35 (10), 1217-1256, **2010**.
- [157] W. P. Ye, F. S. Du, W. H. Jin, J. Y. Yang, Y. Xu, “*In vitro* degradation of poly(caprolactone), poly(lactide) and their block copolymers: Influence of composition, temperature and morphology” *React. Funct. Polym.* 32 (2), 161–168, **1997**.
- [158] H. S. Lee, S. H. Byun, S. W. Cho, B. E. Yang, “Past, present, and future of regeneration therapy in oral and periodontal tissue: A review” *Applied Sciences (Switzerland)*. 9 (6), 1046, **2019**.
- [159] Y. Liu, X. Bai, A. Liang, “Synthesis, properties, and *in vitro* hydrolytic degradation of poly(d,l-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone)” *Int. J. Polym. Sci.* ID 8082014, 1–9, **2016**.
- [160] M. C. Azevedo, R. L. Reis, M. B. Claase, D. W. Grijpma, J. Feijen, “Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials” in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14 (2), 103-107, **2003**.
- [161] Y. Zhu, C. Gao, J. Shen, “Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility” *Biomaterials*. 23(24). 4889–4895, **2002**.
- [162] H. Spread, T. L. Project, T. Krebs, “Krebs’s Cycle” [Internet] chem.libretexts.org/@go. page 460, **2020**.
- [163] R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia, S. N. Upadhyay, “Synthesis of poly(lactic acid): A review” *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*. 45 325-349, **2005**.
- [164] L. Avérous, “Polylactic acid: Synthesis, properties and applications” *Monomers, Polym. Compos. from Renew. Resour.* 433–450, **2008**.
- [165] M. S. Lopes, A. L. Jardini, R. M. Filho, “Synthesis and characterizations of poly (lactic acid) by ring-opening polymerization for biomedical applications” *Chem. Eng. Trans.* 38, 331–336, **2014**.
- [166] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, R. M. Filho, “Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review” *Biotechnol. Adv.* 30 (1), 321–328, **2012**.
- [167] Y. Ohya, K. Nagahama, “Biodegradable polymeric materials” *Drug Deliv. Syst.* 23 (6), 618–626, **2008**.

- [168] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P. V. Hatton, “An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering” *Int. J. Mol. Sci.* 15 (3), 3640–3659, **2014**.
- [169] L. McKeen, “Renewable Resource and Biodegradable Polymers” in *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers*. chapter 14, 449-479, **2012**.
- [170] D. Gorth, T. J. Webster, “Matrices for tissue engineering and regenerative medicine” *Biomater. Artif. Organs.* 270–286, **2010**.
- [171] E. Göktürk, H. Erdal, “Biomedical applications of polyglycolic acid (PGA)” *Sak. Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.* 21 (6), 1237–1244, **2017**.
- [172] Y. Chen, L. Tan, L. Chen, Y. Yang, X. Wang, “Study on biodegradable aromatic/aliphatic copolyesters” *Brazilian J. Chem. Eng.* 15 (2), 321–335, **2008**.
- [173] K. Yamane, H. Sato, Y. Ichikawa, K. Sunagawa, Y. Shigaki, “Development of an industrial production technology for high-molecular-weight polyglycolic acid” *Polymer Journal.* 46, 769-775, **2014**.
- [174] R. N. Shirazi, F. Aldabbagh, A. Erxleben, Y. Rochev, P. McHugh, “Nanomechanical properties of poly(lactic-co-glycolic) acid film during degradation” *Acta Biomater.* 10 (11), 4695–4703, **2014**.
- [175] L. Lu, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, “Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers” *Biomaterials.* 22 (24), 3345-3355, **2001**.
- [176] J. M. Karp, M. S. Shoichet, J. E. Davies, “Bone formation on two-dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds *in vitro*” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 64 (2), 388–396, **2003**.
- [177] M. Arif, M. A. Raja, S. Zeenat, Z. Chi, C. Liu, “Preparation and characterization of polyelectrolyte complex nanoparticles based on poly (malic acid), chitosan. A pH-dependent delivery system” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 28 (1), 50-62, **2017**.
- [178] A. Lanz-Landázuri, M. García-Alvarez, J. Portilla-Arias, A. M. De Ilarduya, E. Holler, J. Ljubimova, S. Muñoz-Guerra, “Modification of microbial polymalic acid with hydrophobic amino acids for drug-releasing nanoparticles” *Macromol. Chem. Phys.* 213 (15), 1623–1631, **2012**.
- [179] C. Braud, C. Bunel, M. Vert, “Poly(β -malic acid): a new polymeric drug-carrier - Evidence for degradation *in vitro*” *Polym. Bull.* 13 (4), 293–299, **1985**.
- [180] X. Zou, C. Cheng, J. Feng, X. Song, M. Lin, S. T. Yang, “Biosynthesis of polymalic acid in fermentation: advances and prospects for industrial application” *Critical Reviews in Biotechnology.* 39 (3), 408–421, **2019**.
- [181] K. Shimada, K. Matsushima, J. Fukumoto, T. Yamamoto, “Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from *Penicillium cyclopium*” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35 (5), 619–624, **1969**.
- [182] H. Fischer, S. Erdmann, E. Holler, “An Unusual Polyanion from *Physarum polycephalum* That Inhibits Homologous DNA Polymerase α *in vitro*” *Biochemistry.* 28 (12), 5219–5226, **1989**.
- [183] N. Nagata, T. Nakahara, T. Tabuchi, “Fermentative production of poly(β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *aureobasidium sp*” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (4), 638–642, **1993**.

- [184] W. Zeng, B. Zhang, Q. Liu, G. Chen, Z. Liang, “Analysis of the L-malate biosynthesis pathway involved in poly(β -L-malic acid) production in *Aureobasidium melanogenum* GXZ-6 by addition of metabolic intermediates and inhibitors” *J. Microbiol.* 57 (2019), 281–287, **2019**.
- [185] Jose Antonio Portilla Arias, “Synthesis, characterization and biomedical applications of microbial polymalic and polyglutamic acids derivatives” *Thesis Manuscript.*, **2008**.
- [186] T. Kajiyama, T. Taguchi, H. Kobayashi, K. Kataoka, J. Tanaka, “Synthesis of high molecular weight poly(α , β -malic acid) for biomedical use by direct polycondensation” *Polym. Degrad. Stab.* 81 (3), 525–530, **2003**.
- [187] T. Kajiyama, H. Kobayashi, T. Taguchi, K. Kataoka, J. Tanaka, “Improved synthesis with high yield and increased molecular weight of poly(α , β -malic acid) by direct polycondensation” *Biomacromolecules.* 5 (1), 169–174, **2004**.
- [188] H. W. Q. Zhou, T. Yang, Y. Qiao, S. Guo, L. Zhu, “Preparation of poly β -L-malic acid based chargeconversional nanoconjugates for tumor specific uptake and cellular delivery” 10 (1), 1914-1952, **2018**.
- [189] O. Coulembier, P. Degée, J. L. Hedrick, P. Dubois, “From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives” *Progress in Polymer Science (Oxford).* 31 (8), 723–747, **2006**.
- [190] O. Coulembier, P. Degée, S. Cammas-Marion, P. Guérin, P. Dubois, “New amphiphilic poly[(R,S)- β -malic acid-*b*- ϵ -caprolactone] diblock copolymers by combining anionic and coordination-insertion ring-opening polymerization” *Macromolecules.* 35 (27), 9896–9903, **2002**.
- [191] N. Nagata, T. Nakahara, T. Tabuchi, R. Morita, J. R. Brewer, S. Fujishige, “Characterization of poly(β -L-malic acid) produced by *aureobasidium sp.* a-91” *Polymer Journal.* 25 (6), 585–592, **1993**.
- [192] E. Vene, G. Barouti, K. Jarnouen, T. Gicquel, C. Rauch, C. Ribault, S. M. Guillaume, S. Cammas-Marion, P. Loyer, “Opsonisation of nanoparticles prepared from poly(β -hydroxybutyrate) and poly(trimethylene carbonate)-*b*-poly(malic acid) amphiphilic diblock copolymers: Impact on the *in vitro* cell uptake by primary human macrophages and HepaRG hepatoma cells” *Int. J. Pharm.* 513 (1–2), 438–452, **2016**.
- [193] G. Barouti, A. Khalil, C. Orione, K. Jarnouen, S. Cammas-Marion, P. Loyer, S. M. Guillaume, “Poly(trimethylene carbonate)/Poly(malic acid) Amphiphilic Diblock Copolymers as Biocompatible Nanoparticles” *Chem - A Eur. J.* 22 (8), 2819–2830, **2016**.
- [194] G. Barouti, S. M. Guillaume, “Polyhydroxybutyrate (PHB)-based triblock copolymers: Synthesis of hydrophobic PHB/poly(benzyl β -malolactonate) and amphiphilic PHB/poly(malic acid) analogues by ring-opening polymerization” *Polym. Chem.* 7 (28), 4603–4608, **2016**.
- [195] H. T. Oyama, D. Tanishima, and S. Maekawa, “Poly(malic acid-*co*-L-lactide) as a superb degradation accelerator for Poly(L-lactic acid) at physiological conditions” *Polym. Degrad. Stab.* 134 (2016), 265–271, **2016**.
- [196] Z. W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J. Y. Jubimova, E. Holler, T. Benvegna, P. Loyer, S. Cammas-Marion, “New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery” *Int. J. Pharm.* 423 (1), 84–92, **2012**.

- [197] H. Ding, J. Portilla-Arias, R. Patil, K. L. Black, J. Y. Ljubimova, E. Holler, “The optimization of poly(malic acid) peptide copolymers for endosomal drug delivery” *Biomaterials*. 32 (22), 5269–5278, **2011**.
- [198] H. Ding, J. Portilla-Arias, R. Patil, K. L. Black, J. Y. Ljubimova, E. Holler, “Distinct mechanisms of membrane permeation induced by two poly(malic acid) copolymers” *Biomaterials*. 34 (1), 217–225, **2013**.
- [199] P. Loyer, S. Cammas-Marion, “Natural and synthetic poly(malic acid)-based derivatives: A family of versatile biopolymers for the design of drug nanocarriers” *J. Drug Target*. 22 (7), 556–575, **2014**.
- [200] S. Cammas, M. M. Béar, L. Moine, R. Escalup, G. Ponchel, K. Kataoka, P. Guérin, “Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices” *International Journal of Biological Macromolecules*. 25 (1-3), 273-282, **1999**.
- [201] E. Elmowafy, A. Abdal-Hay, A. Skouras, M. Tiboni, L. Casettari, V. Guarino, “Polyhydroxyalkanoate (PHA): Applications in drug delivery and tissue engineering” *Expert Rev. Med. Devices*. 16 (6), 467–482, **2019**.
- [202] A. Shrivastav, H. Y. Kim, Y. R. Kim, “Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system” *BioMed Research International*. 1–12, 2013, **2013**.
- [203] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, I. Radecka, “Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates” *Journal of Applied Microbiology*. 102 (6), 1437-1449, **2007**.
- [204] A. Steinbüchel, T. Lütke-Eversloh, “Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms” *Biochemical Engineering Journal*. 16 (2), 81-96, **2003**.
- [205] S. Ray, V. C. Kalia, “Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates” *Indian Journal of Microbiology*. 57 (3), 261-269, **2017**.
- [206] M. A. Prieto, L. I. D. Eugenio, B. Galàn, J. M. Luengo, B. Witholt, “Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates” *Pseudomonas*, chapter 14, 397-428, **2007**.
- [207] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, “Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53 (1), 5–21, **2001**.
- [208] D. Y. Kim, W. K. Hyung, G. C. Moon, H. R. Young, “Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates” *Journal of Microbiology*. 45 (2), 87-97, **2007**.
- [209] C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, V. C. Kalia, “Polyhydroxyalkanoates: An overview” *Bioresour. Technol.* 87 (2), 137–146, **2003**.
- [210] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez, “Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging” *Express Polym. Lett.* 8 (11), 791–808, **2014**.
- [211] H. Hezaveh, I. I. Muhamad, “Effect of MgO nanofillers on burst release reduction from hydrogel nanocomposites” *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 1443-1453, **2013**.
- [212] E. P. Da Silva, M. R. Guilherme, F. P. Garcia, C. V. Nakamura, L. Cardozo-Filho, C. G. Alonso, A. F. Rubira, M. H. Kunita, “Drug release profile and reduction in the *in vitro* burst release from pectin/HEMA hydrogel nanocomposites crosslinked with titania” *RSC Adv.* 6 (23), 19060–19068, **2016**.

- [213] N. G. R. Rao, P. Soumya, K. Revathi, B. S. Nayak, "A review on pulsatile drug delivery system" *Int. Res. J. Pharm.* 4 (3), 31–44, **2013**.
- [214] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, A. Domínguez-Gil, J. L. Pedraz, "Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals" *Trends in Pharmacological Sciences.* 25 (7), 382-387, **2004**.
- [215] I. Krögel, R. Bodmeier, "Floating or pulsatile drug delivery systems based on coated effervescent cores" *Int. J. Pharm.* 187 (2), 175–184, **1999**.
- [216] I. Krögel, R. Bodmeier, "Evaluation of an enzyme-containing capsular shaped pulsatile drug delivery system" *Pharm. Res.* 16, 1424–1429, **1999**.
- [217] W. B. Liechty, D. R. Kryscio, B. V. Slaughter, N. A. Peppas, "Polymers for Drug Delivery Systems" *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 1, 149–173, **2010**.
- [218] Y. H. Yun, B. K. Lee, K. Park, "Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation" *J. Control. Release.* 219, 2–7, **2015**.
- [219] A. Raval, J. Parikh, C. Engineer, "Mechanism of controlled release kinetics from medical devices" *Brazilian J. Chem. Eng.* 27 (2), 211–225, **2010**.
- [220] R. Belibel, C. Barbaud, "Synthesis of new optically active α , α' , β -trisubstituted β -lactones as monomers for stereoregular biopolyesters" *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 53 (22), 2586–2597, **2015**.
- [221] C. Barbaud, F. Abdillah, F. Fabienne, M. Guerrouache, P. Guérin, "Synthesis of new α , α' , β -trisubstituted β -lactones as monomers for hydrolyzable polyesters" *Des. Monomers Polym.* 6 (4), 353–367, **2003**.
- [222] C. Barbaud, M. Guerrouache, P. Guérin, "Synthesis of novel α , α , β -trisubstituted β -lactones" *Tetrahedron Lett.* 43, 9513–9515, **2002**.
- [223] R. Belibel, "Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly (acide 3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires" *Thesis Manuscript*, **2015**.

Partie II : Résultats et discussion

Chapitre 1 : Étude de l'adhésion protéique sur les dérivés de PDMMLA

1. Introduction

Afin de développer un revêtement adéquat pour les dispositifs médicaux, il est nécessaire d'analyser les propriétés physicochimiques du matériau utilisé. Les propriétés de surface jouent un rôle majeur dans la mise en œuvre d'un biomatériau, étant donné qu'une fois implanté, les interactions avec le milieu physiologique ont lieu à l'interface de ce dernier.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'adhésion des différentes protéines sur la surface des dérivés de PDMMLA avec différents pourcentages d'hydrophilie (groupements -COOH). L'étude est réalisée en mesurant la force, reflétant l'énergie de surface de chaque dérivé en présence ou en absence d'une solution protéique.

Dans la continuité des études sur les dérivés de PDMMLA, les expériences sont menées sur trois surfaces de PDMMLA, le PDMMLAH_{10-co}-Hex₉₀ (PDMMLA 10/90) [P5], le PDMMLAH_{20-co}-Hex₈₀ (PDMMLA 20/80) [P6] et le PDMMLAH_{30-co}-Hex₇₀ (PDMMLA 30/70) [P7].

Il est connu que les interactions sang/polymère sont établies suivant une série de processus à l'interface de ces derniers. Généralement, ces interactions sont classifiées comme suit :

- Adsorption des protéines plasmatiques à la surface du polymère,
- Activation des systèmes kinine/kallikréine¹ de cellules sanguines et de la coagulation intrinsèque initiée par les protéines adsorbées,
- Adhésion des composants cellulaires sur les protéines,
- Formation de la fibrine sur la surface et activation des systèmes fibrinolytiques.²

Ces interactions dépendent de plusieurs facteurs, notamment des propriétés de surface du polymère, de sa composition chimique et des conditions physiologiques dans lesquelles les interactions ont lieu.³

1.1. Intérêt de l'étude de l'adhésion des protéines sur le polymère

L'adsorption des protéines sur le biomatériau est le premier événement qui se produit après son implantation dans l'organisme vivant. En effet, la surface du biomatériau est rapidement recouverte d'une couche de sérum ou de protéines plasmatiques. Une fois adsorbées, les protéines peuvent se réorienter librement ou changer de conformation, affectant la mouillabilité de la surface du biomatériau, son énergie de surface et ses interactions avec le

milieu qui l'entoure.⁴ Les études des interactions surface/protéines sont donc importantes pour une meilleure compréhension du comportement cellulaire et de la réponse biologique vis-à-vis du biomatériau *via* les interactions surface/cellules. Ces interactions jouent un rôle central dans la régulation des mécanismes cellulaires (adhésion, migration et prolifération) et dépendent des propriétés physico-chimiques de la surface du biomatériau, telles que la rugosité, la mouillabilité et la charge de surface.⁵⁻⁷ L'adhésion cellulaire sur une surface est médiée par l'adhésion des protéines contenues dans le milieu physiologique *via* les interactions protéines/cellules.⁸ Ainsi, la capacité d'un biomatériau à adsorber les protéines dans une conformation favorable déterminera sa capacité à induire l'adhésion et la migration cellulaires (interactions surface/protéines/cellules), un aspect fondamental de la biocompatibilité des surfaces.

La figure 1.1 est une représentation schématique de l'adhésion protéique et de l'adhésion cellulaire sur une surface de biomatériau.

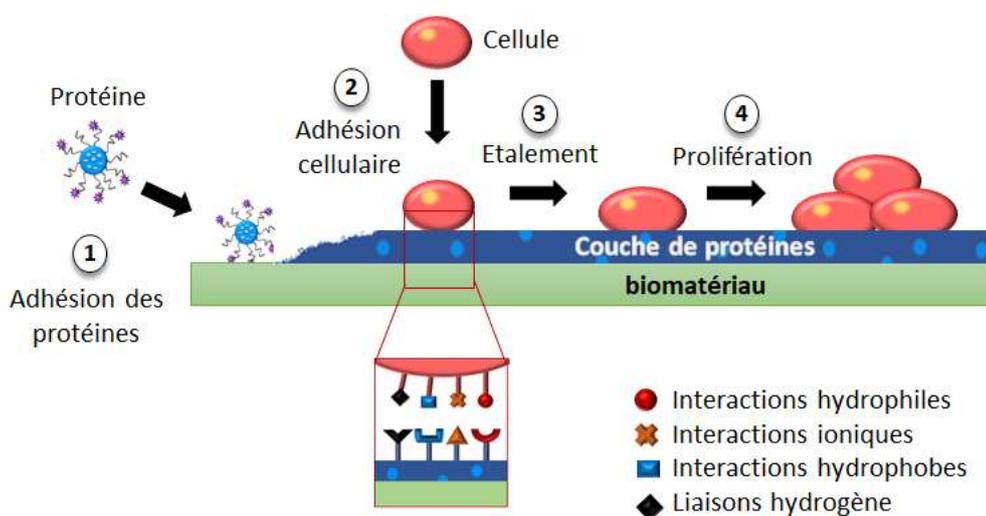


Figure 1.1 : Représentation schématique de la formation d'une couche protéique sur la surface d'un biomatériau.

Les cellules (ici les cellules endothéliales) adhèrent et prolifèrent sur la couche protéique formée.

L'adsorption initiale des protéines sur une surface se produit très rapidement et évite les interactions directes entre les cellules et la surface.⁹ Cette adsorption peut être favorisée ou, au contraire inhibée par la modification de surface impliquant l'hydratation des protéines et des surfaces, la redistribution des charges à l'interface des protéines et les changements de conformation.¹⁰ La figure 1.2 illustre l'adsorption des protéines par leurs différentes faces sur des surfaces de différentes charges et polarités.¹¹ La caractérisation de l'adsorption des protéines sur différentes surfaces permet de mieux comprendre les phénomènes physiologiques et d'orienter la réponse cellulaire.

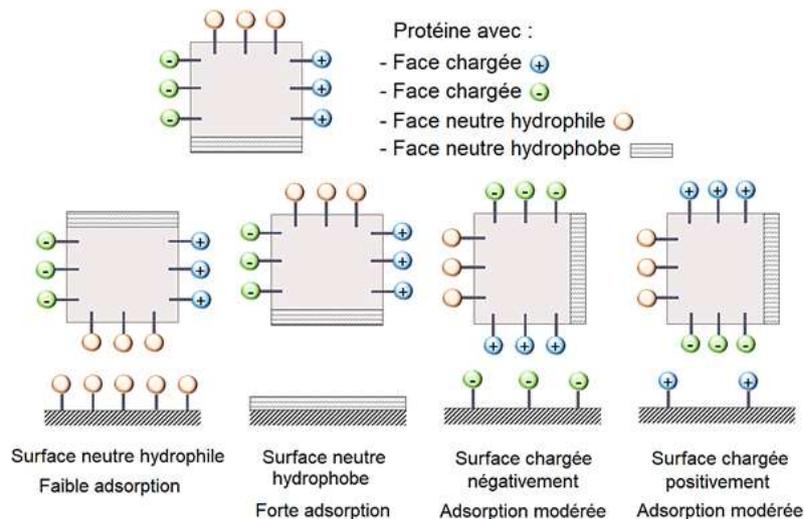


Figure 1.2 : Représentation schématique de l'adsorption protéique sur des surfaces avec différentes charges et polarités

La force d'adsorption est dépendante de la charge et de la polarité de la surface de la protéine et de la surface du substrat ou matériau. Figure adaptée de la publication de Palacio et Bhushan.¹¹

1.2. Protéines étudiées

Dans cette partie, nous avons sélectionné l'albumine du sérum bovin (BSA), le fibrinogène (Fb), la fibronectine (Fn), la vitronectine (Vn) et un protéoglycane transmembranaire, le syndécan-4 (SDC-4) afin de réaliser l'étude de leur adhésion sur les différentes surfaces de PDMMLA.

• Albumine

L'albumine sérique humaine (HSA) est une protéine globulaire composée de 585 acides aminés (figure 1.3). Cette macromolécule multi-domaines est la protéine la plus abondante du plasma avec une gamme de concentration plasmatique entre 35 et 50 g/L. La principale fonction de la HSA est la régulation de la pression oncotique du sang et la modulation de la distribution des fluides dans l'organisme.¹² Elle est utilisée en médecine pour le traitement de plusieurs maladies, comme par exemple l'hypovolémie, l'hémorragie, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, les maladies chroniques du foie, ou encore l'hypoalbuminémie.¹³

La HSA possède des propriétés d'antioxydant ; en effet, elle permet une protection contre la peroxydation des lipides propagés par les dérivés réactifs de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species* = ROS) inorganiques. Les recherches ont démontré que plus de 70% de l'activité de piégeage des radicaux libres du plasma sanguin est réalisée par la HSA.^{14,15}

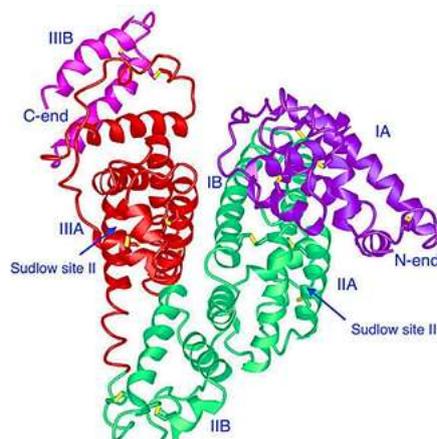


Figure 1.3 : La structure cristalline de l'albumine sérique humaine

La structure primaire de la HSA se compose de deux extrémités (*N*-terminal et *C*-terminal) et de trois domaines homologues I, II et III. Chacun de ces domaines a deux sous-domaines : IA et IB, IIA et IIB, IIIA et IIIB respectivement et contient 4 à 6 hélices α , ainsi que le site de Sudlow I et le site de Sudlow II.¹⁶

L'albumine sérique bovine ou la BSA (protéine chimiquement similaire à la HSA) est utilisée en laboratoire afin de réaliser les études d'adhésion protéique sur les dérivés de PDMMLA.

- **Fibrinogène**

Le fibrinogène (Fb) est une glycoprotéine qui comporte deux demi-molécules constituées chacune de trois chaînes polypeptides différentes, appelées $A\alpha$, $B\beta$, et γ . Ces polypeptides sont interconnectés *via* des liaisons disulfures aux extrémités *N*-terminales des chaînes et engendrent donc la structure hétérogène du fibrinogène (figure 1.4). Cette protéine est synthétisée par les hépatocytes et est présente dans le plasma avec une gamme de concentration allant de 1.5 à 4.5 g/L.¹⁷

En cas d'endommagement d'un tissu, le fibrinogène se transforme en fibrine par l'action de l' α -thrombine qui vient désassembler les fibrinopeptides A et B, situés aux extrémités *N*-terminales des polypeptides $A\alpha$ et $B\beta$ respectivement. Les monomères de fibrine se polymérisent alors spontanément et se réticulent, afin de former un caillot de fibrine en présence de la transglutaminase (ou le facteur XIIIa).¹⁸

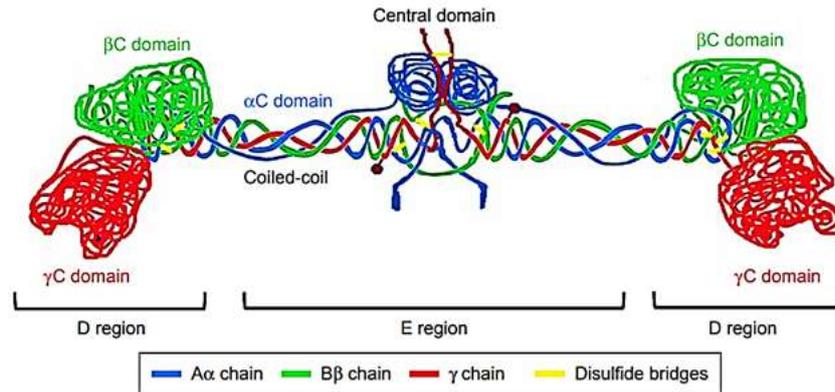


Figure 1.4 : Représentation schématique de la structure du fibrinogène

Glycoprotéine avec deux demi-molécules avec des chaînes polypeptidiques A α en bleu, B β en vert et γ en rouge et les ponts disulfures en jaune. Les polypeptides sont liés au niveau des extrémités N-terminales des chaînes *via* des liaisons disulfures au domaine central de la glycoprotéine.¹⁹

Le fibrinogène/fibrine, joue un rôle important dans le processus d'hémostase et de coagulation, ce qui est essentiel pour limiter la perte de sang et la cicatrisation des plaies. Il est également connu que le fibrinogène/fibrine et ses produits de dégradation favorisent des processus tels que l'angiogenèse, la migration et la prolifération des cellules comme par exemple les fibroblastes, les CMLs et les lymphocytes, phénomènes importants dans la réparation tissulaire.²⁰

• Fibronectine

La fibronectine (Fn) est une glycoprotéine multi-domaines d'environ 440 kDa qui régule l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire.²¹ De plus, elle fournit un support structural pour la survie des cellules et l'organisation tissulaire, l'expression génique, ou encore la signalisation des facteurs de croissance.²²

La fibronectine est une protéine dimère, constituée de deux chaînes polypeptidiques de masses molaires proches ou identiques (230 à 270 kDa), liées par une liaison disulfure au C-terminal des chaînes. Ces monomères sont des sous-unités multi-modulaires, organisées en sites de liaison pour le collagène, les intégrines, l'héparine, la fibrine et d'autres molécules extracellulaires (figure 1.5).^{21,23}

La fibronectine plasmatique est synthétisée dans le foie par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma sanguin. Elle est inactive et soluble sous forme globulaire avec une gamme de concentration de 200 à 400 $\mu\text{g/mL}$.^{24,25}

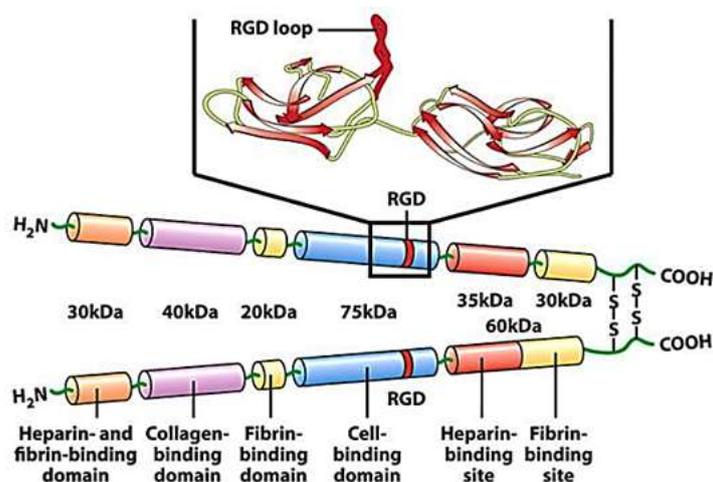


Figure 1.5 : Structure de la fibronectine dimère

La fibronectine est constituée de différents domaines de liaison pour la fibrine, l'héparine, les cellules et le collagène ²⁶

La fibronectine cellulaire, quant à elle, est synthétisée par différentes cellules comme les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages, et ne représente que 5% de la quantité totale de fibronectine dans le corps.²⁷ Elle est insoluble sous forme fibrillaire et se situe au niveau intracellulaire à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire.^{24,28} La fibronectine cellulaire est sécrétée dans un premier temps par les cellules (généralement par les fibroblastes) sous forme de dimères solubles, puis assemblée pour former une matrice fibrillaire insoluble.²⁹ En effet, les dimères solubles de fibronectine se lient aux récepteurs des intégrines à la surface des cellules et aident à regrouper les intégrines. La concentration locale en fibronectine-intégrine augmente et facilite l'interaction des molécules de fibronectine liées. Ces interactions forment alors de courtes fibrilles de fibronectine entre les cellules adjacentes, et au fur et à mesure de l'assemblage, ces fibrilles solubles se transforment en plus grandes fibrilles insolubles.^{25,29} Ce processus est important dans la coagulation du sang, l'hémostase et la réparation tissulaire.

• Vitronectine

La vitronectine (Vn) est une glycoprotéine qui présente une activité similaire à celle de la fibronectine en termes d'adhésion et propagation cellulaire, réorganisation, réparation et remodelage tissulaire.³⁰ Produite et sécrétée par le foie, cette protéine de 75 kDa est présente dans le plasma sanguin avec une gamme de concentration entre 250 et 450 µg/mL.³¹ Plus de 95% de la vitronectine plasmatique reste sous forme de monomère/dimère en conformation repliée et peu réactive vis-à-vis des cellules ou autres protéines.³²

La vitronectine de la matrice extracellulaire favorise l'adhésion cellulaire en s'attachant aux cellules *via* la séquence RGD.^{33,34} Le tripeptide RGD constitué d'arginine (R), de glycine (G) et d'acide aspartique (D) est reconnu comme le site de liaison de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, notamment de la fibronectine et de la vitronectine. Cet attachement est établi par la liaison de la séquence RGD à ses récepteurs, les intégrines, présentes sur les cellules.³⁵

En plus de leur rôle dans l'hémostase et la reconstruction tissulaire, ces protéines sont des médiatrices importantes dans l'adhésion des cellules sur la surface des biomatériaux.

- **Syndécan-4**

Les syndécans (SDC)s sont des protéoglycanes transmembranaires à héparane sulfate (HSPG) synthétisés par de nombreuses cellules. Les syndécans se lient aux ligands extracellulaires *via* leurs chaînes d'héparane sulfate (HS) attachées de manière covalente, et influencent les événements intracellulaires *via* des voies de signalisation transmembranaires.³⁶

Les protéoglycanes sont constitués d'une protéine centrale à laquelle sont liés de manière covalente de longs polymères de glucides non ramifiés, appelés des glycosaminoglycanes (GAGs). Ils sont présents dans chaque compartiment tissulaire, dans les matrices extracellulaires, sur les surfaces cellulaires, intracellulaires dans les granules et même dans le noyau.^{36,37} La famille des syndécans est composée de quatre membres (figure 1.6)^{38,39} : le syndécan-1 est majoritairement présent dans les cellules épithéliales,⁴⁰ le syndécan-2 est principalement sur les cellules d'origine mésenchymateuse,^{41,42} le syndécan-3 se trouve essentiellement dans le tissu et le cartilage neuronaux,^{43,44} et enfin, le syndécan-4 a une distribution ubiquitaire.^{38,42}

Dans le cadre de notre étude, le syndécan-4 attire particulièrement l'attention grâce à son rôle majeur dans les fonctions biologiques, telles que la régulation de la coagulation sanguine, l'adhésion et la croissance cellulaire.⁴⁵ Il interagit avec la matrice extracellulaire, les anticoagulants et les facteurs de croissance, et régule également le cytosquelette d'actine.⁴⁶ Le syndécan-4 est l'unique membre de cette famille qui représente un composant d'adhésion focale transmembranaire grâce à ses interactions avec les intégrines sur la fibronectine et sur la vitronectine.^{46,47}

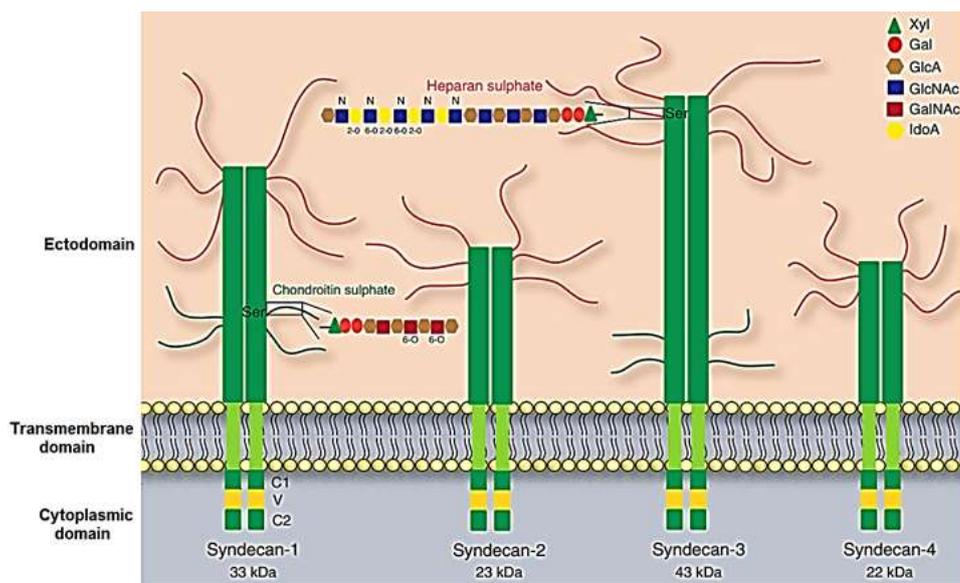


Figure 1.6 : Représentation schématique des quatre syndécans vertébrés

Les protéines centrales des SDC-1 et SDC-3 sont plus grandes que celles des SDC-2 et SDC-4 et peuvent porter à la fois des chaînes de HS et de chondroïtine sulfate (CS).⁴²

Les études de Baeyens *et al.* montrent que la délétion du syndécan-4 non seulement augmente considérablement la charge de la plaque athéroscléreuse chez les souris hypercholestérolémiques, mais aussi provoque la formation de plaques dans les régions qui normalement résistent aux maladies. Ces études affirment que le syndécan-4 est spécifiquement requis pour l'alignement des cellules endothéliales dans le flux et suggèrent que son absence provoque la perte du mécanisme athéroprotecteur, conduisant à une augmentation de l'athérosclérose chez la souris.⁴⁸

Il est donc intéressant d'étudier le profil d'adhésion de ce protéoglycane sur la surface d'un biomatériau compte tenu de son rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire.

1.3. Mouillabilité et énergie de surface

Comme évoquées précédemment, les propriétés physicochimiques de surface sont d'une importance primordiale dans le développement d'un biomatériau adéquat. La composition chimique du matériau influence considérablement la mouillabilité de la surface grâce à la présence de différents groupements chimiques dans sa structure.

Les biomatériaux tels que les stents, les prothèses valvulaires cardiaques, les greffons vasculaires, les membres d'hémodialyse, ou encore les filtres de la veine cave, sont utilisés comme dispositifs de contact avec le sang. D'une part, la pose de ces dispositifs entraîne souvent un dommage tissulaire sur la zone de traitement. Par ailleurs, l'incorporation d'un corps

étranger dans le corps déclenche l'adhésion et l'activation des plaquettes en réponse à cette action. Les plaquettes activées sécrètent alors des facteurs prothrombotiques, conduisant à une coagulation.⁴⁹ Dans des conditions normales de rétablissement, cette réponse immunitaire est favorable, voire nécessaire pour la coagulation du sang. Cependant, dans certains cas, l'activation excessive des plaquettes et du complément devient nuisible, donnant lieu à la formation d'un caillot sanguin. Dans le cas d'une sténose par exemple, où la lumière artérielle rétrécit suite à la formation d'une plaque, des dispositifs percutanés, tels qu'un stent et une chirurgie de pontage sont employés afin de rétablir un flux sanguin normal. Ces interventions provoquent une perturbation de la paroi artérielle. Après une implantation d'un stent, une resténose intra-stent est observée dans environ 20 à 30% des patients.^{50,51} L'agrégation plaquettaire, la migration et la prolifération des CMLs et la libération de facteurs de croissance sont responsables de l'hyperplasie néo-intimale, provoquant un nouveau rétrécissement de la lumière artérielle, postérieur à la pose du stent.^{52,53}

Compte tenu de l'action des plaquettes, qui peut varier selon la différence de l'hydrophilie/hydrophobie d'une surface, les propriétés de surface doivent être soigneusement examinées.^{54,55} Ainsi, le dispositif de contact ne provoquant pas de thrombose serait considéré comme biocompatible.

Dans ce chapitre, l'adhésion protéique sur la surface des différents dérivés de PDMMLA est étudiée. Nous avons utilisé la méthode de Wilhelmy qui permet également de mesurer la force de surface d'un substrat.

1.4. La méthode de Wilhelmy

C'est une méthode indirecte de la mesure d'angle de contact. L'appareil de mesure, le tensiomètre, est muni d'une microbalance sensible, à laquelle est accroché une plaque ou une lamelle, recouverte d'un film d'échantillon. La plaque est plongée dans un liquide de référence ayant une tension de surface connue et la force exercée « F » est mesurée par un dynamomètre.^{55,56} Les angles de contact d'avancée et de retrait peuvent être déterminés à partir des mesures de force à l'immersion et à l'émersion de l'échantillon respectivement (figure 1.7). La force mesurée est exprimée suivant l'équation 1 :

$$F = \gamma_{lv}.L.\cos\theta \quad \text{Équation 1}$$

où F est la force mesurée en Newton (N), γ_{lv} est la tension de surface du liquide en Newton/mètre ($N.m^{-1}$), L est la longueur mouillée de l'échantillon en mètre (m) et θ est l'angle de contact à l'avancée ou au retrait.⁵⁷

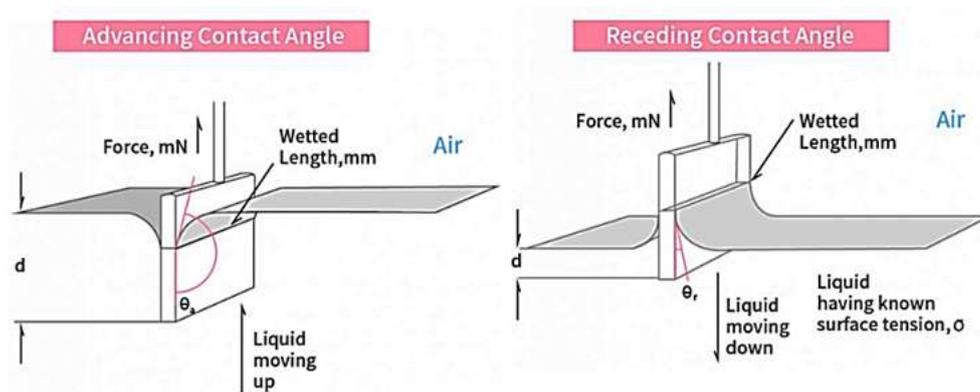


Figure 1.7 : Représentation schématique de la méthode de Wilhelmy

La force de surface de l'échantillon est mesurée en mode dynamique à l'immersion (avancée/mouillage) et à l'émersion (retrait/démouillage) dans le liquide. L'angle engendré entre l'échantillon en immersion/émersion et le liquide de référence permet de mesurer la force appliquée et donc de déterminer le niveau d'hydrophilie/hydrophobie de la surface de l'échantillon. Plus F est élevée, plus la surface est hydrophile.⁵⁷

La méthode Wilhelmy permet d'enregistrer les changements dynamiques de mouillabilité d'une surface avec le temps. De tels changements peuvent être dus par exemple à des changements de température et à une adsorption à différentes interfaces. Cette technique permet également de détecter les changements de la configuration interfaciale après adsorption (des protéines par exemple).^{58,59}

La figure 1.8 montre l'enregistrement d'un cycle d'immersion/émersion par la méthode de Wilhelmy, ainsi que l'allure d'un cycle d'une plaque de verre nu.

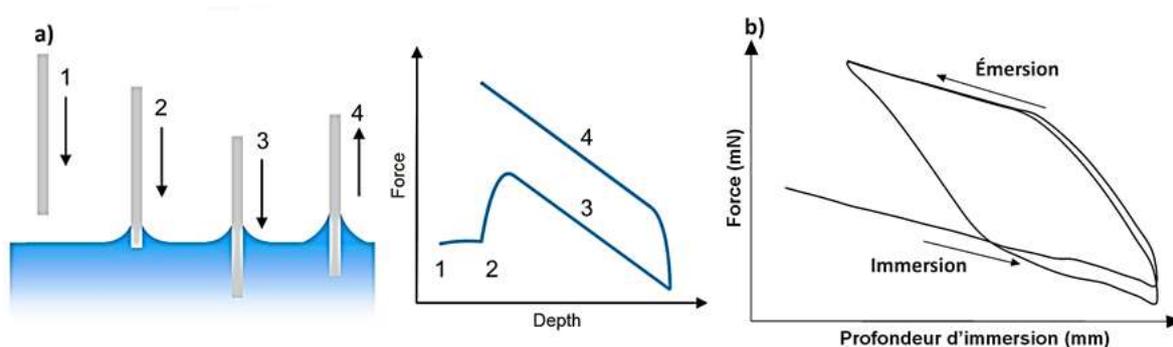


Figure 1.8 : Représentation graphique de la méthode de Wilhelmy.

a) Un cycle d'immersion pour la mesure de la force de surface : (1) L'échantillon s'approche du liquide ; (2) L'échantillon entre en contact avec la surface du liquide (premier contact) et forme un angle de contact $\theta < 90^\circ$; le liquide monte et provoque une force de mouillage positive ; (3) L'échantillon est immergé davantage et avec l'augmentation de la flottabilité une diminution de la force est détectée sur la balance. (4) L'échantillon est retiré du liquide après avoir atteint la profondeur déterminée.⁵⁷ b) Profil de la force pour un cycle d'immersion/émersion, mesurée par la méthode de Wilhelmy pour une plaque en verre.

2. Méthodologie

L'étude de l'adhésion protéique est effectuée sur trois dérivés de PDMMLA : le PDMMLA 10/90 [P5], le PDMMLA 20/80 [P6] et le PDMMLA 30/70 [P7]. L'expérience est réalisée grâce à la méthode de Wilhelmy *via* la mesure de la force à l'immersion de chaque copolymère dans une solution protéique. La force mesurée reflète la mouillabilité (et donc l'énergie) de la surface selon l'équation 1 qui montre la relation entre la force et l'angle de contact.

Des films de chaque copolymère ont été préparés sur des plaques en verre afin d'effectuer les cycles d'immersion/émersion avec le tensiomètre. Dans un premier temps, une expérience de blanc a été réalisée en effectuant les cycles d'immersion/émersion des échantillons dans une solution de PBS en absence de protéines. Puis, pour les profils d'adhésion des polymères, l'expérience a été reproduite dans différentes solutions protéiques : des solutions d'albumine sérique bovine (BSA), de fibrinogène (Fb), de fibronectine (Fn), de vitronectine (Vn) et de syndécan-4 (SDC -4) dans le PBS. Les valeurs de force mesurées lors de chaque expérience ont permis de comparer les profils d'adhésion de chaque protéine avec l'expérience de blanc de chaque copolymère.

3. Résultats et discussion

3.1. Expérience de blanc

Dix cycles d'immersion/émersion ou mouillage/démouillage de chaque copolymère sont réalisés dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Les valeurs de force « F » à l'immersion (ou mouillage), mesurées pour les trois copolymères sont représentées en fonction du nombre de cycles d'immersion (figure 1.9).

L'augmentation de la valeur de F indique l'augmentation du caractère hydrophile de la surface, car la valeur de l'angle de contact entre le PBS et la surface hydrophile est faible.

Ces expériences montrent que F croît avec l'augmentation des groupements chimiques à caractère hydrophile, les acides carboxyliques -COOH. On constate donc que F est la plus grande pour le copolymère 30/70 par rapport aux copolymères 20/80 et 10/90. Ces derniers révèlent une ligne de base entre 3 et 4 mN : $F_{10/90} = 3.53 \pm 0.03$ mN et $F_{20/80} = 3.72 \pm 0.05$ mN.

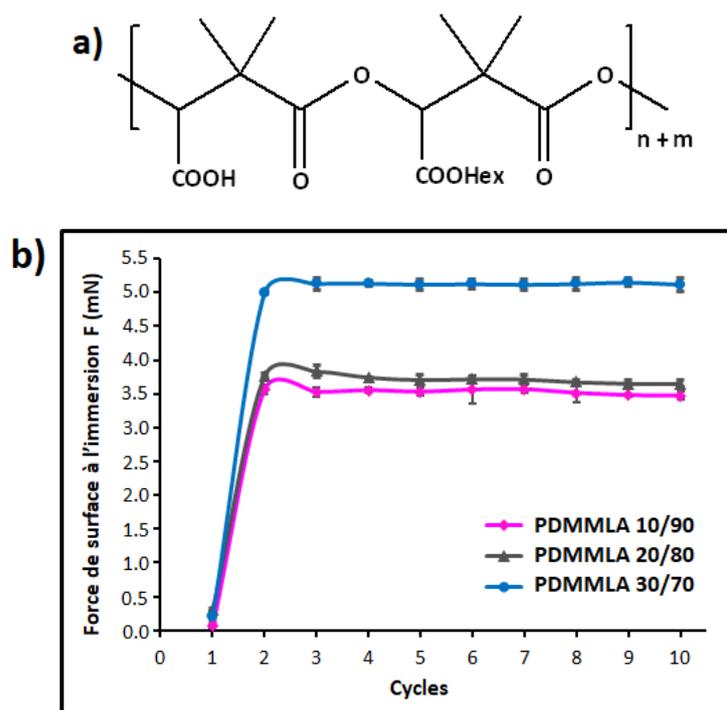


Figure 1.9 : Structure des copolymères de PDMMLA et les courbes de force (F) des expériences de blanc

- a) $n = 10$ pour PDMMLA 10/90, $n = 20$ pour PDMMLA 20/80 et $n = 30$ pour PDMMLA 30/70.
 b) La force est mesurée à l'immersion des copolymères PDMMLA 10/90 [P5], PDMMLA 20/80 [P6] et PDMMLA 30/70 [P7] dans le PBS ($n = 3$). F est exprimée en fonction du nombre de cycles d'immersion.

Les valeurs de F sont légèrement plus élevées pour le copolymère 20/80 en raison de la présence de 20% de groupements hydrophiles contre 10% pour le copolymère 10/90 ($p > 0.05$). Cette faible augmentation de F confirme bien l'augmentation de l'hydrophilie de la surface en présence de plus de groupements -COOH. Néanmoins, cette hausse n'est pas suffisante pour faire une différence considérable entre ces deux surfaces. En revanche, des valeurs de F bien plus élevées sont obtenues pour le copolymère 30/70 ($F_{30/70} = 5.11 \pm 0.04$ mN). Cela engendre un écart significatif entre les copolymères 20/80 et 30/70 avec l'ajout de 10% de groupements -COOH supplémentaires ($p < 0.05$).

On peut expliquer que dans le cas des copolymères 10/90 et 20/80, avec la présence respective de 90% et 80% de fonctions ester hexylique (-COOHex), les groupements acide carboxylique sont masqués et donc moins exposés par l'auto-organisation de ces chaînes latérales hydrophobes, tandis que dans le cas du copolymère 30/70, le polymère a plus de possibilités d'exposer ces groupements hydrophiles à l'interface entre la surface du polymère et le milieu aqueux. Ces chaînes sont donc davantage exposées à la surface par rapport aux copolymères précédents. En effet, le pourcentage des motifs hydrophiles a un impact significatif sur l'effet de mobilité des chaînes.

3.2. Adsorption/désorption des protéines

Dans cette expérience, les cinq premiers cycles correspondent aux cycles d'immersion d'un échantillon dans une solution de protéines et les cinq derniers cycles correspondent aux cycles d'immersion du même échantillon dans le PBS. Les cycles 1 à 5 reflètent donc les valeurs de F pour l'adsorption et les cycles 6 à 10 montrent les valeurs de F pour la désorption/rinçage.

Chaque courbe obtenue avec les protéines est comparée à celle du PBS seul, obtenue avec le film polymère correspondant.

- Une courbe d'adhésion qui se superpose à la ligne de base ($\Delta F = 0$) indique que l'adsorption de la protéine ne change pas l'hydrophilie de la surface.
- Une courbe d'adhésion au-dessus de la ligne de base ($\Delta F > 0$), indique que la protéine est adsorbée *via* des interactions hydrophobes, exposant ainsi ses groupements hydrophiles à la surface, car F augmente.
- Une courbe inférieure à la ligne de base ($\Delta F < 0$) indique que l'adsorption a lieu *via* des interactions hydrophiles, exposant des groupements hydrophobes de la protéine à la surface, car F diminue.

Quant à l'étape de désorption/rinçage, trois cas peuvent être observés :

- La courbe de rinçage s'approche de la ligne de base, cela signifie que la protéine est soit désorbée ($\Delta F = 0$), soit réorientée ($\Delta F \neq 0$).
- La courbe de F reste stable sans changement : la protéine est adsorbée sans réorientation ni désorption.
- F varie par rapport à la courbe d'adsorption (augmente ou diminue) : la protéine est adsorbée et change de conformation ou se réoriente.

Trois types de forces d'interaction ont été considérés dans cette étude : les interactions ioniques, les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes. Les interactions de liaison ionique et hydrogène sont dominantes avec les groupements carboxyliques, tandis que les interactions hydrophobes sont dominantes avec les groupements ester hexylique des chaînes latérales des polymères.

Dans tous les cas étudiés, une faible valeur de F est enregistrée pour le premier cycle d'immersion (cycle 1 pour l'adsorption et cycle 6 pour le rinçage). Il s'agit du premier contact entre la surface et la solution lors duquel la pression superficielle diminue avec l'augmentation de la tension interfaciale polymère-air-solution. Les cycles stabilisés sont établis et forment un

contact polymère-solution à partir du deuxième cycle : cycle 2 pour l'adsorption et cycle 7 pour le rinçage.

La figure 1.10 montre les profils d'adsorption/désorption de la BSA sur les trois surfaces de PDMMLAs. La BSA adhère fortement à la surface du PDMMLA 10/90 *via* des interactions hydrophobes. La surface devient légèrement plus hydrophile lors du rinçage ($\Delta F_{\text{Ads}(10/90)}^{\text{BSA}} = 0.46 \pm 0.005 \text{ mN}$). La BSA adsorbée change de conformation lors de l'étape de rinçage, ΔF diminue légèrement comparé à l'étape d'adsorption restant tout de même positif ($\Delta F_{\text{Des}(20/80)}^{\text{BSA}} = 0.15 \pm 0.01 \text{ mN}$). Ceci est confirmé par le cas du PDMMLA 20/80 contenant plus de groupements hydrophiles. L'adhésion du BSA se fait par des interactions plus hydrophiles par rapport au PDMMLA 10/90, mais son adhésion ne change pas l'hydrophilie de la surface. La force d'adsorption/désorption est très proche de celle du PBS seul, $\Delta F_{\text{Ads}(20/80)}^{\text{BSA}} = 0.03 \pm 0.07$ et $\Delta F_{\text{Des}(20/80)}^{\text{BSA}} = -0.05 \pm 0.08 \text{ mN}$.

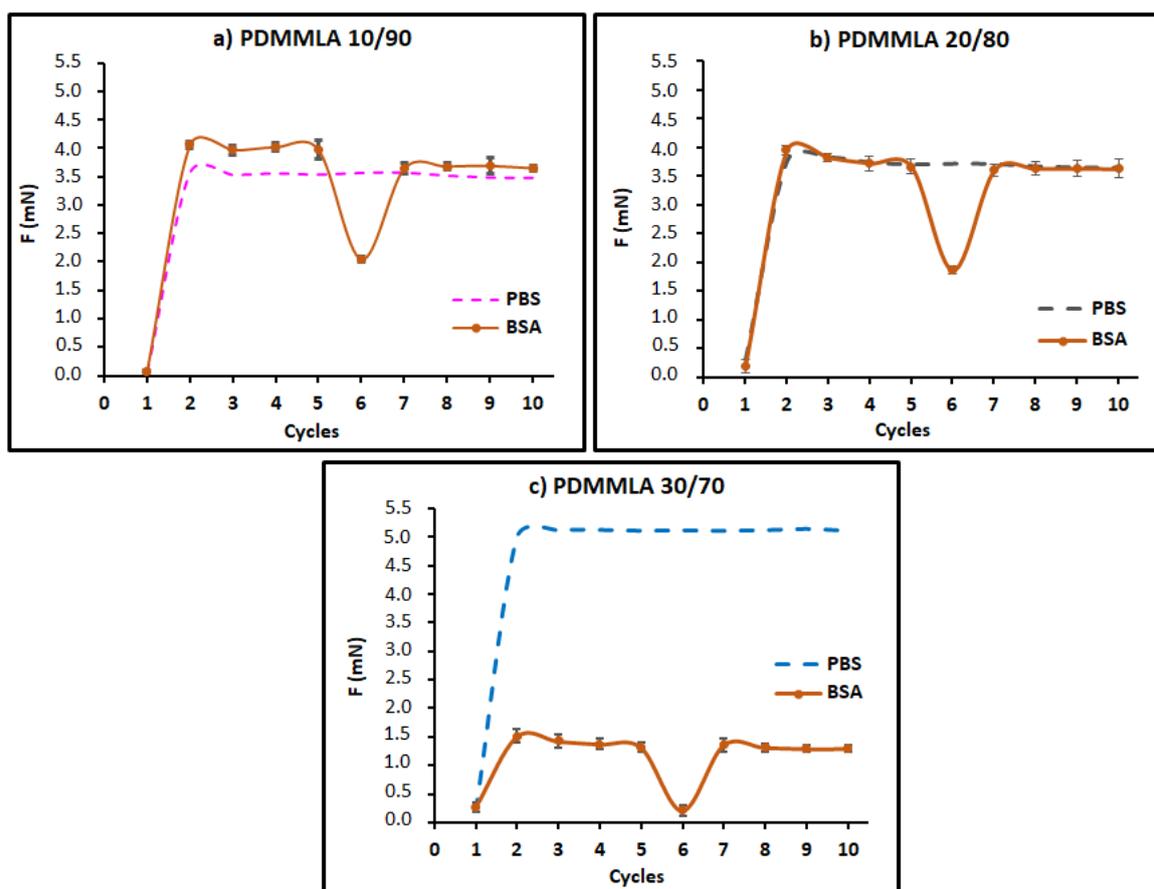


Figure 1.10 : Profils d'adsorption/désorption (rinçage) de la BSA

F est mesurée à l'immersion des copolymères a) PDMMLA 10/90, b) PDMMLA 20/80, c) PDMMLA 30/70 dans une solution de BSA (cycles 1 à 5), puis dans le PBS (cycles 6 à 10) (n = 3).

Concernant le PDMMLA 30/70, la surface est adaptée pour réaliser des interactions hydrophiles, ainsi que des liaisons hydrogène et des interactions ioniques, grâce à la disponibilité augmentée des groupements $-COOH$. Toute la BSA adhérente reste attachée à la surface et ne change pas de conformation lors de l'étape de rinçage ; $\Delta F_{Ads(30/70)}^{BSA} = -3.67 \pm 0.02$ mN et $\Delta F_{Des(30/70)}^{BSA} = -3.81 \pm 0.01$ mN.

En conclusion, le pouvoir d'adsorption de la BSA augmente à mesure que le caractère hydrophile augmente, ce qui signifie que l'affinité de la BSA par des interactions hydrophobes est réduite.

Les résultats des expériences avec les autres protéines étudiées sont représentés sur la figure 1.11.

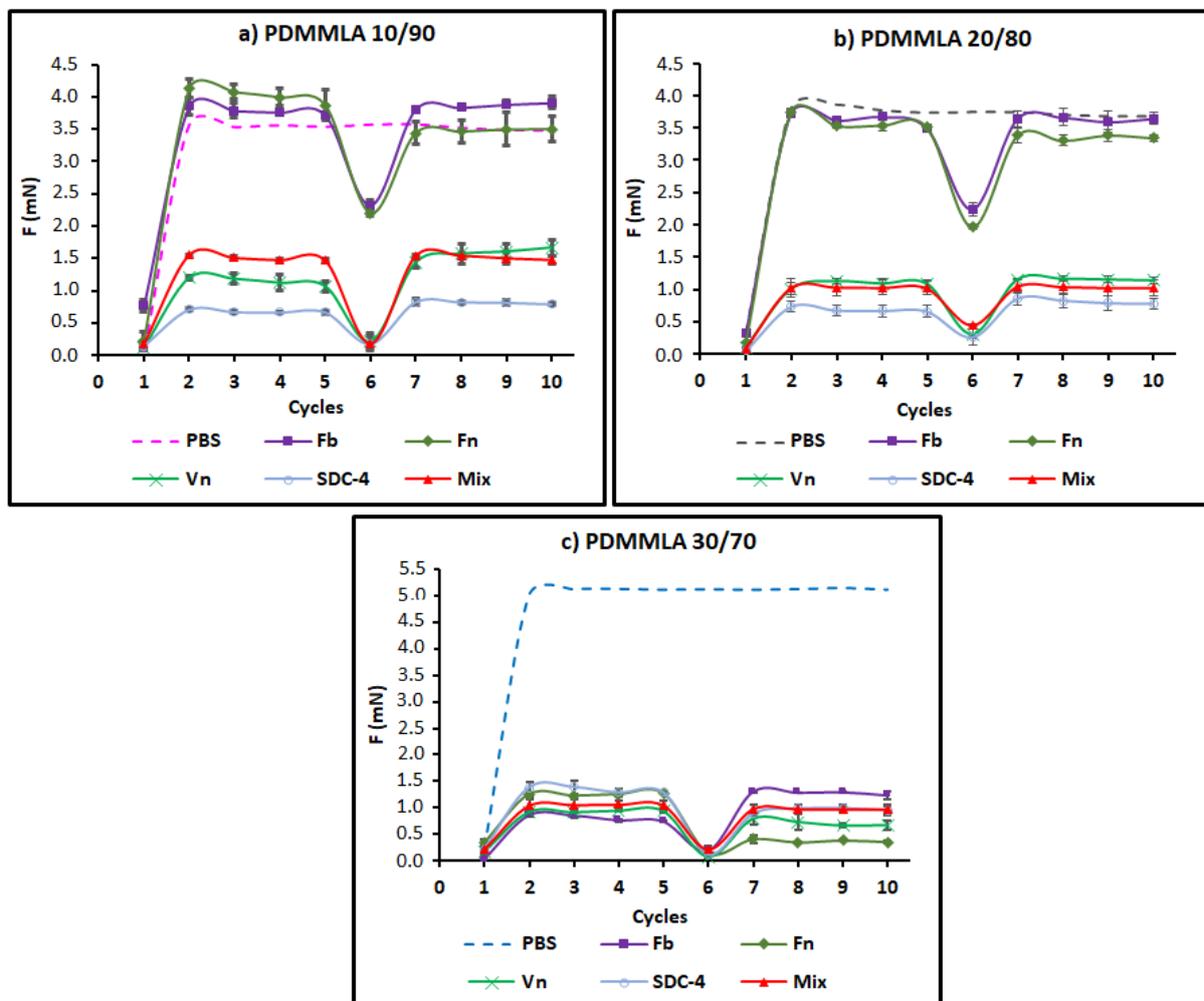


Figure 1.11 : Profils d'adsorption/désorption du fibrinogène, de la fibronectine, de la vitronectine et du syndécan-4

F est mesurée à l'immersion des copolymères a) PDMMLA 10/90, b) PDMMLA 20/80, c) PDMMLA 30/70 dans la solution protéique, puis dans le PBS ($n = 3$).

D'après les résultats expérimentaux, il est visible que du copolymère 10/90 (la plus hydrophobe des surfaces) au copolymère 30/70 (la plus hydrophile des surfaces), les surfaces deviennent de plus en plus hydrophobes après l'adhésion de différentes protéines.

Dans le cas des copolymères 10/90 et 20/80, on observe des valeurs de F plus proches de celles du blanc (PBS) pour la BSA, le fibrinogène et la fibronectine. Cependant, ces valeurs de F sont plus faibles pour la vitronectine et le syndécan-4. Un ΔF négatif signifie que l'adhésion de ces derniers rend la surface étudiée plus hydrophobe qu'au départ.

Sur la surface du copolymère 30/70, toutes les protéines montrent des profils similaires. Adsorbées, elles exposent leurs groupements hydrophobes à la surface, ce qui signifie que l'augmentation de l'hydrophilie de la surface du polymère favorise les interactions hydrophiles, ioniques et les adhésions de type liaison hydrogène.

Concernant la vitronectine, présentant une courbe hydrophobe pour les trois surfaces 10/90, 20/80 et 30/70 ($\Delta F_{\text{Ads}}^{Vn} = -2.40 \pm 0.02, -2.69 \pm 0.02$ et -4.17 ± 0.01 mN, respectivement), on peut en conclure que cette dernière établit les mêmes types d'interaction sur les trois surfaces étudiées, soient des interactions ioniques ou des liaisons hydrogène.

Le protéoglycane syndécan-4, présente également un comportement similaire sur les trois copolymères avec une faible différence de valeurs de F ($\Delta F_{\text{Ads}(10/90)}^{SDC-4} = -2.87 \pm 0.04$ mN, $\Delta F_{\text{Ads}(20/80)}^{SDC-4} = -3.09 \pm 0.04$ mN et $\Delta F_{\text{Ads}(30/70)}^{SDC-4} = -3.76 \pm 0.002$ mN (30/70)).

La courbe « Mix » représente le comportement d'un mélange de toutes les protéines étudiées, donnant des informations sur l'affinité des protéines à la surface et la compétitivité entre les protéines. Comme observées avec les protéines, du copolymère le plus hydrophobe au copolymère le plus hydrophile, les valeurs de F sont de plus en plus faibles pour la courbe « Mix » (tableau 1.1 et figure 1.11). Le tableau 1.1 récapitule les valeurs expérimentales de ΔF obtenues pour les trois copolymères en présence de chacune des protéines, ainsi que le mélange de toutes ces dernières.

Dans le cas des copolymères 10/90 et 20/80, la courbe la plus proche de celle du « Mix » est celle de la vitronectine, ce qui signifie que cette protéine a une affinité importante pour ces surfaces.

Quant au copolymère 30/70, toutes les courbes sont rassemblées autour de la courbe « Mix ». Cela signifie qu'en présence de toutes les protéines étudiées, la surface devient hydrophobe et toutes les protéines montrent une affinité similaire à cette surface, avec une faible compétitivité même si la dominance de la vitronectine reste visible.

La mobilité des groupements -COOH sur la surface du copolymère 30/70 entraîne une exposition plus importante de ces derniers à la surface, conduisant à des interactions hydrophiles entre la surface et les protéines. En effet, à pH neutre, ces groupements sont présents sous forme d'anion carboxylate (-COO⁻), qui favorisent également la formation des liaisons ioniques et hydrogène. Les protéines adhérentes exposent ainsi leurs groupements hydrophobes à la surface et diminuent la valeur de F (le niveau d'hydrophilie).

Tableau 1.1 : ΔF à l'adsorption et à la désorption des protéines

Force de surface des copolymères PDMMLA 10/90, PDMMLA 20/80 et PDMMLA 30/70, comparée à la ligne de base (PBS seul) après l'adhésion de différentes protéines. ΔF est la différence de F d'adsorption/désorption et le blanc

	ΔF (mN) 10/90		ΔF (mN) 20/80		ΔF (mN) 30/70	
	Adsorption	Désorption	Adsorption	Désorption	Adsorption	Désorption
BSA	++ (0.46 ± 0.005)	+ (0.15 ± 0.01)	0 (0.03 ± 0.07)	0 (-0.05 ± 0.09)	---- (-3.69 ± 0.02)	---- (-3.81 ± 0.01)
Fn	++ (0.47 ± 0.09)	0 (-0.03 ± 0.13)	- (-0.20 ± 0.02)	- (-0.34 ± 0.04)	---- (-3.85 ± 0.04)	---- (-4.76 ± 0.05)
Fb	+ (0.24 ± 0.01)	+ (0.35 ± 0.02)	- (-0.16 ± 0.04)	0 (-0.06 ± 0.08)	---- (-4.29 ± 0.04)	---- (-3.85 ± 0.06)
Vn	--- (-2.40 ± 0.02)	-- (-1.94 ± 0.06)	--- (-2.70 ± 0.02)	--- (-2.53 ± 0.001)	---- (-4.17 ± 0.01)	---- (-4.41 ± 0.01)
SDC-4	---- (-2.87 ± 0.04)	--- (-2.70 ± 0.03)	---- (-3.09 ± 0.04)	--- (-2.87 ± 0.06)	---- (-3.76 ± 0.001)	---- (-4.17 ± 0.02)
Mix	--- (-2.04 ± 0.03)	-- (-1.99 ± 0.01)	--- (-2.75 ± 0.06)	--- (-2.65 ± 0.07)	---- (-4.04 ± 0.01)	---- (-4.15 ± 0.01)

La surface: (+) devient plus hydrophile, (-) devient plus hydrophobe, et (0) ne change pas après l'adhésion protéique.

En étudiant l'ensemble des copolymères et des protéines, on peut voir la tendance globale entre la force interfaciale et le pourcentage d'hydrophilie (%A) des copolymères. Les histogrammes de la figure 1.12 montrent les variations des profils de protéines sur les différentes surfaces de PDMMLA pendant les cycles d'adsorption/désorption, et la corrélation linéaire de F avec le pourcentage d'hydrophilie %A. La pente correspond à la sensibilité de la corrélation et R² est le coefficient de corrélation. R² et la pente sont calculés pour la force interfaciale F. La droite est tracée à partir des valeurs moyennes de F correspondant aux trois copolymères étudiés.

À l'exception du protéoglycane membranaire syndécan-4 qui donne le même profil que le blanc, l'hydrophobie de surface croît linéairement avec %A (diminution de F) pour toutes les protéines étudiées. En effet, on observe une augmentation de F avec le %A dans le cas du syndécan-4 avec $R^2_{Ads (SDC-4)} = 0.75$ et $R^2_{Des (SDC-4)} = 0.70$.

La vitronectine présente la sensibilité la plus élevée associée à un excellent coefficient de corrélation R^2 qui est très proche de 1 pour l'adsorption ($R^2_{Ads (Vn)} = 0.97$) et égal à 1 pour la désorption. Les résultats de la BSA et de la fibronectine sont également intéressants ($R^2_{Ads (BSA)} = 0.81$ et $R^2_{Ads (Fn)} = 0.87$) et le fibrinogène présente également un R^2 proche de 0.8.

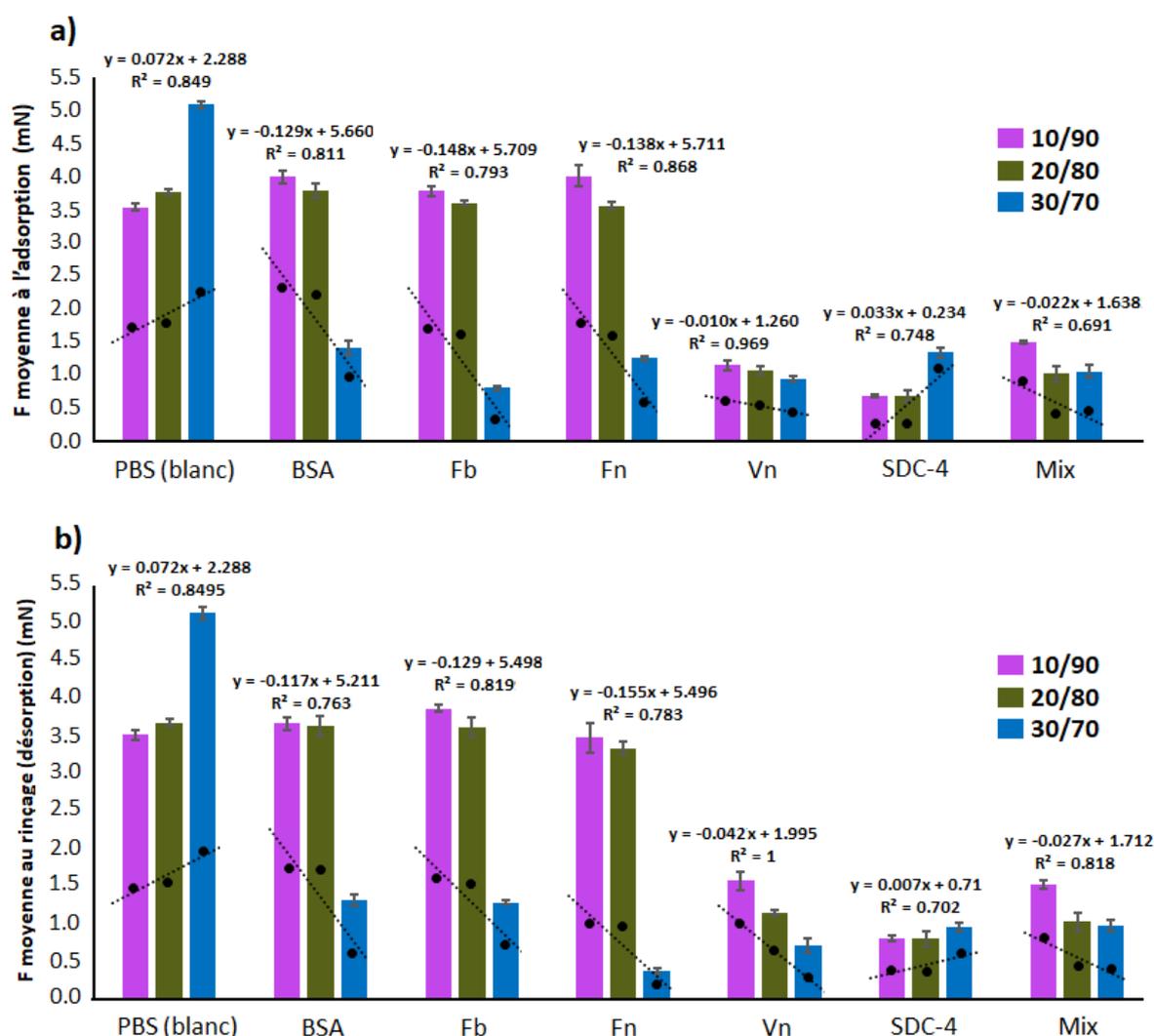


Figure 1.12 : Variation des profils d'adhésion des protéines sur les copolymères de PDMMLA et la corrélation linéaire de F avec %A

a) adsorption, b) désorption (rinçage) Pour tous les échantillons.

Les valeurs moyennes de F ont été calculées à partir des valeurs obtenues après le cycle de stabilisation.

La tendance de F pour le Mix ne présente pas une corrélation linéaire avec le %A. En effet, on constate une légère augmentation de F dans le cas du PDMMLA 30/70 comparé au PDMMLA 20/80 pour d'adsorption, avec un coefficient de corrélation associé, R^2 loin de 1.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, les profils d'adhésion de différentes protéines sur différentes surfaces de PDMMLA ont été analysés *via* la technique de DCA, dans le but de déterminer la surface la plus adéquate de PDMMLA, en tant que revêtement de stent.

Les résultats obtenus montrent que sur la surface du PDMMLA 30/70, toutes les protéines montrent un comportement similaire avec des courbes d'adhésion bien inférieures à celle du PBS. Toutes les protéines étudiées adhèrent à la surface *via* des liaisons hydrogène, des interactions hydrophiles et ioniques, et rendant la surface du polymère plus hydrophobe qu'au point de départ.

L'expérience « Mix » montre le comportement global d'un mélange de protéines vis-à-vis de la surface polymère. Seul dans le cas du copolymère 30/70 toutes les courbes sont rassemblées autour de la courbe « Mix ». Ce faible écart entre les courbes montre que l'affinité des protéines étudiées à la surface 30/70 est similaire.

L'étude montre qu'il existe une forte corrélation entre l'hydrophilie de surface et l'adhésion protéique sur les copolymères étudiés. En effet, à l'exception du syndécan-4, toutes les protéines présentent une F moyenne décroissante du copolymère 10/90 au copolymère 30/70.

La vitronectine donne une courbe de sorption hydrophobe pour les trois surfaces, ce qui signifie que cette dernière n'effectue qu'un seul type d'interaction avec toutes les surfaces. Elle présente également la corrélation linéaire parfaite entre la F moyenne et le pourcentage d'hydrophilie %A.

Le protéoglycane transmembranaire syndécan-4, montre également un comportement similaire sur toutes les surfaces étudiées.

Les résultats des études menées sur le comportement cellulaire vis-à-vis de ces trois copolymères montrent que les cellules HUVECs sont plus susceptibles d'adhérer sur la surface plus hydrophobe, c'est-à-dire le copolymère 10/90. Cependant, l'étalement et la croissance de ces cellules pourraient exiger une surface modérément hydrophile, le copolymère 30/70.⁶⁰ Par

conséquent, afin de valider le choix du polymère 30/70, des études plus approfondies sont nécessaires autour de la réponse cellulaire sur les surfaces polymères recouvertes d'une couche protéique, en présence et en l'absence des facteurs de croissance et d'autres paramètres affectant la croissance cellulaire.

Références

- [1] S. Murabayashi, Y. Nose, "Biocompatibility: Bioengineering aspects" *Biomed. Mater. Eng.* 23 (1–2), 129–142, **2013**.
- [2] S. Sundaram, J. M. Courtney, D. P. Taggart, A. C. Tweddel, W. Martin, A. M. McQuiston, D. J. Wheatley, G. D. O. Lowe, "Biocompatibility of cardiopulmonary bypass: Influence on blood compatibility of device type, mode of blood flow and duration of application" *Int. J. Artif. Organs.* 17 (2), 118–128, **1994**.
- [3] X. Zhao, J. M. Courtney, H. Qian, "Blood interface biomaterials" *Biomater. Devices Circ. Syst.* 24–53, **2010**.
- [4] T. G. Ruardy, H. E. Moorlag, J. M. Schakenraad, H. C. Van Der Mei, H. J. Busscher, "Growth of fibroblasts and endothelial cells on wettability gradient surfaces" *J. Colloid Interface Sci.* 188 (1), 209–217, **1997**.
- [5] C. M. Alves, R. L. Reis, J. A. Hunt, "The dynamics, kinetics and reversibility of protein adsorption onto the surface of biodegradable materials" *Soft Matter.* 6 (17), 4135–4143, **2010**.
- [6] F. Rupp, D. Axmann, C. Ziegler, J. Geis-Gerstorfer, "Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon® AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis" *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (4), 567–578, **2002**.
- [7] C. Müller, J. Wald, W. Hoth-Hannig, N. Umanskaya, D. Scholz, M. Hannig, C. Ziegler, "Protein adhesion on dental surfaces-a combined surface analytical approach" *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (3), 679–689, **2011**.
- [8] M. A. Felgueiras, H. P. Antunes, J. C. Martins, M. Cristina L. Barbosa, "Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials" *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair.* 1–27, **2018**.
- [9] Z. Sheikh, P. J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer, "Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials" *Materials.* 8 (9), 5671-5701, **2015**.
- [10] R. A. Hartvig, M. Van De Weert, J. Østergaard, L. Jorgensen, H. Jensen, "Protein adsorption at charged surfaces: The role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation" *Langmuir.* 27 (6), 2634–2643, **2011**.
- [11] M. L. B. Palacio, B. Bhushan, "Research article: Bioadhesion: A review of concepts and applications" *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (1967), 2321–2347, **2012**.
- [12] G. J. Quinlan, G. S. Martin, T. W. Evans, "Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential" *Hepatology.* 41 (6), 1211-1219, **2005**.
- [13] G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, "Human serum albumin: From bench to bedside" *Molecular Aspects of Medicine.* 33 (3), 209-290, **2012**.
- [14] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, "The antioxidant properties of serum albumin" *FEBS Letters.* 582 (13), 1783-1787, **2008**.
- [15] E. Bourdon, D. Blache, "The importance of proteins in defense against oxidation" *Antioxidants and Redox Signaling.* 3 (2), 293-311, **2001**.

- [16] S. Wang, S. Liu, Y. Zhang, J. He, D. H. Coy, L. Sun, “Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle Abstract” *Heal. Sci. J.* 14 (2), 1–8, **2020**.
- [17] S. Herrick, O. Blanc-Brude, A. Gray, G. Laurent, “Fibrinogen” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (7), 741–746, **1999**.
- [18] M. W. Mosesson, “Fibrinogen and fibrin structure and functions” *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 3 (8), 1894-1904, **2005**.
- [19] A. Noori, S. J. Ashrafi, R. Vaez-Ghaemi, A. Hatamian-Zaremi, T. J. Webster, “A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering” *International Journal of Nanomedicine.* 12, 4937-4961, **2017**.
- [20] J. Koo, D. Galanakis, Y. Liu, A. Ramek, A. Fields, X. Ba, M. Simon, M. H. Rafailovich, “Control of anti-thrombogenic properties: Surface-induced self-assembly of fibrinogen fibers” *Biomacromolecules.* 13 (5), 1259–1268, **2012**.
- [21] J. E. Schwarzbauer, D. W. DeSimone, “Fibronectins, their fibrillogenesis, and *in vivo* functions” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 3 (7), a005041, **2011**.
- [22] J. A. Faralli, M. K. Schwinn, J. M. Gonzalez, M. S. Filla, D. M. Peters, “Functional properties of fibronectin in the trabecular meshwork” *Experimental Eye Research.* 88 (4), 689-693, **2009**.
- [23] R. Raghov, “Connective Tissues of the Subendothelium” *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald’s Heart Disease: Second Edition.* chapter 4, 43-69, **2013**.
- [24] J. Guan, J. Trevithick, R. Hynes, “Fibronectin / integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein” *Cell Regul.* 2 (11), 951–964, **1991**.
- [25] W. S. To, K. S. Midwood, “Plasma and cellular fibronectin: Distinct and independent functions during tissue repair” *Fibrogenesis and Tissue Repair.* 4 (1), 21, **2011**.
- [26] Y. Wang, H. Ni, “Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis” *Cellular and Molecular Life Sciences.* 73, 3265–3277, **2016**.
- [27] A. Conde-Agudelo, R. Romero, J. M. Roberts, “Tests to predict preeclampsia” *Chesley’s Hypertensive Disorders in Pregnancy, Fourth Edition,* chapter 11, 221-251, **2014**.
- [28] M. Sieber-Blum, F. Sieber, K. M. Yamada, “Cellular fibronectin promotes adrenergic differentiation of quail neural crest cells *in vitro*” *Exp. Cell Res.* 133 (2), 285–295, **1981**.
- [29] P. Singh, C. Carraher, J. E. Schwarzbauer, “Assembly of fibronectin extracellular matrix” *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 26 (1), 397-419, **2010**.
- [30] H. P. Felgueiras, M. D. M. Evans, V. Mignonney, “Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti6Al4V” *Acta Biomater.* 28, 225–233, **2015**.
- [31] K. T. Preissner, “Structure and biological role of vitronectin” *Annual Review of Cell Biology.* 275–310, **1991**.
- [32] K. T. Preissner, U. Reuning, “Vitronectin in vascular context: Facets of a multitasking matricellular protein” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 37 (4), 408-424, **2011**.
- [33] Z. M. Ruggeri, S. P. Jackson, “Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood” *Platelets.*, chapter 20, 399-423, **2013**.

- [34] S. Bierbaum, D. Scharnweber, "Artificial extracellular matrices to functionalize biomaterial surfaces" *Comprehensive Biomaterials*. 127–153, **2011**.
- [35] E. Ruoslahti, "RGD and other recognition sequences for integrins" *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12 (1), 697-715, **1996**.
- [36] D. J. Carey, "Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors" *Biochem. J.* 327, Pt 1 (1), 1–16, **1997**.
- [37] J. R. Couchman, "Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4 (12), 926-937, **2003**.
- [38] T. Szatmári, K. Dobra, "The role of syndecan-1 in cellular signaling and its effects on heparan sulfate biosynthesis in mesenchymal tumors" *Frontiers in Oncology*. 3, article 310, 1-11, **2013**.
- [39] C. W. Kim, O. A. Goldberger, R. L. Gallo, M. Bernfield, "Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns." *Mol. Biol. Cell*. 5 (7), 797–805, **1994**.
- [40] S. Saunders, M. Jalkanen, S. O'Farrell, M. Bernfield, "Molecular cloning of syndecan, an integrated membrane proteoglycan" *J. Cell Biol.* 108 (4), 1547–1556, **1989**.
- [41] P. Marynen, J. Zhang, J. J. Cassiman, H. Van den Berghe, G. David, "Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface" *J. Biol. Chem.* 264 (12), 7017–7024, **1989**.
- [42] T. Manon-Jensen, Y. Itoh, J. R. Couchman, "Proteoglycans in health and disease: The multiple roles of syndecan shedding" *FEBS Journal*. 277 (19), 3876-3889, **2010**.
- [43] D. J. Carey, D. M. Evans, R. C. Stahl, V. K. Asundi, K. J. Conner, P. Garbes, G. Cizmeci-Smith, "Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan" *J. Cell Biol.* 117 (1), 191–201, **1992**.
- [44] S. E. Gould, W. B. Upholt, R. A. Kosher, "Syndecan 3: A member of the syndecan family of membrane-Intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (8), 3271–3275, **1992**.
- [45] J. R. Couchman, A. Woods, "Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion" *J. Cell Sci.* 112 (20), 3414–3420, **1999**.
- [46] A. Woods, J. R. Couchman, "Syndecans: Synergistic activators of cell adhesion" *Trends in Cell Biology*. 8 (5), 189-192, **1998**.
- [47] A. Woods, J. R. Couchman, "Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component" *Mol. Biol. Cell*. 5 (2), 183–192, **1994**.
- [48] N. Baeyens, M. J. Mulligan-Kehoe, F. Corti, D. D. Simon, T. D. Ross, J. M. Rhodes, T. Z. Wang, C. O. Mejean, M. Simons, J. Humphrey, M. Schwartz, "Syndecan 4 is required for endothelial alignment in flow and atheroprotective signaling" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (48), 17308–17313, **2014**.

- [49] J. M. Courtney, N. M. K. Lamba, S. Sundaram, C. D. Forbes, "Biomaterials for blood-contacting applications" *Biomaterials*. 15 (10), 737–744, **1994**.
- [50] M. S. Kim, L. S. Dean, "In-Stent Restenosis" *Cardiovascular Therapeutics*. 29 (3), 190–198, **2011**.
- [51] R. A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati, "Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014" *Eur Hear. J.* 36 (47), 3320–3331, **2015**.
- [52] S. O. Marx, H. Totary-Jain, A. R. Marks, "Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis" *Circ. Cardiovasc. Interv.* 4 (1), 104–111, **2011**.
- [53] M. B. Hoffmann, R. Mintz, G S. Dussailant, G R. Popma, J J. Pichard, A D. Satler, L F. Kent, K M. Griffin, J. Leon, "Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study" *Circulation*. 94 (6), 1247–1254, **1996**.
- [54] R. Tzoneva, T. Groth, G. Altankov, D. Paul, "Remodeling of fibrinogen by endothelial cells in dependence on fibronectin matrix assembly. Effect of substratum wettability" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 13 (12), 1235-1244, **2002**.
- [55] K. L. Menzies, L. Jones, "The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials" *Optom. Vis. Sci.* 87 (6), 387–399, **2010**.
- [56] A. W. Neumann, R. J. Good, "Techniques of Measuring Contact Angles" *Surf. Colloid Sci.* chapter 2, 31-91, **1979**.
- [57] Y. Yuan, T. R. Lee, "Contact angle and wetting properties" *Springer Ser. Surf. Sci.* 51, 3–34, **2013**.
- [58] R. Belibel, T. Avramoglou, A. Garcia, C. Barbaud, L. Mora, "Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: A static contact angle analysis of polyester model films" *Mater. Sci. Eng. C*. 59, 998–1006, **2016**.
- [59] S. Benni, T. Avramoglou, H. Hlawaty, L. Mora, "Dynamic Contact Angle Analysis of Protein Adsorption on Polysaccharide Multilayer's Films for Biomaterial Reendothelialization" *Biomed Res. Int.* 2014, 1–10, **2014**.
- [60] R. Belibel, S. Sali, N. Marival, A. Garcia-Sanchez, C. Barbaud, H. Hlawaty, "PDMMLA derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Physicochemical and biological evaluation" *Mater. Sci. Eng. C*. 117, 111284, **2020**.

Chapitre 2 : Greffage covalent de molécules sur la β -lactone acide et les dérivés de PDMMLA

1. Introduction

L'objectif principal dans l'étude des dérivés de PDMMLA est de développer un biopolymère pour le revêtement de stents métalliques cardiovasculaires. Les études antérieures sur les dérivés de PDMMLA ont prouvé leur grand potentiel, du point de vue de la dégradation,¹ des propriétés physicochimiques² et biologiques.³

Le développement d'un polymère amphiphile présente un avantage notable, compte tenu de l'importance de la cinétique de dégradation de ce dernier une fois implanté dans l'organisme vivant. À titre d'exemple, la dégradation complète du PLA, l'un des polymères biodégradables les plus utilisés dans ce domaine, peut s'étendre jusqu'à plusieurs mois.¹ La présence durable du polymère, en particulier dans le cas des stents vasculaires, peut provoquer des complications dans la zone de traitement, comme une thrombose tardive sur stent. La structure chimique hydrophobe du PLA est donc considérée comme un défaut majeur pour ce polymère, malgré toutes ses propriétés intéressantes. D'autre part, les polymères plus hydrophiles, comme le PGA, se dégradent beaucoup plus rapidement.⁴⁻⁶ Cela limite également leur utilisation dans ce domaine, étant donné que cette dégradation rapide ne permet pas d'assurer les objectifs initialement visés par l'emploi d'un polymère.

Dans le cas du PDMMLA, outre la possibilité d'élaborer un polymère amphiphile, nous sommes en mesure d'ajuster le niveau d'hydrophilie du polymère final.⁷ L'augmentation du nombre des groupements -COOH, permet d'augmenter le niveau d'hydrophilie dans un copolymère de PDMMLA. De plus, la présence de ces groupements rend possible le greffage covalent de principes actifs et ainsi d'étudier la cinétique de libération du médicament.

Dans le cas des revêtements polymères comme le PLA ou le PLGA, le principe actif est présent *via* des interactions physiques. Le plus souvent, les stents sont recouverts de plusieurs couches de polymère, enfermant le principe actif entre deux couches afin de permettre une libération plus lente et constante de celui-ci.⁸ L'épaisseur du revêtement polymère, devenue plus importante, peut entraîner des problèmes supplémentaires vis-à-vis de la dégradation de celui-ci.

Le greffage covalent du médicament sur le polymère pourrait donc potentiellement améliorer sa cinétique de libération après l'implantation du stent et permettre d'établir de meilleures conditions de revascularisation de la paroi artérielle. L'objectif de ce chapitre est de mettre en évidence la possibilité du greffage covalent sur les dérivés de PDMMLA et de mettre en avant les stratégies employées lors de la réalisation de ce projet.

1.1. 4-carboxyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone ou β -lactone acide [8]

Dans le but de prouver la possibilité du greffage covalent sur les dérivés de PDMMLA, l'expérience a été réalisée dans un premier temps sur un dérivé des unités monomères du PDMMLA, le 4-carboxyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone acide) [8]. En effet, cette β -lactone acide est la forme déprotégée de la β -lactone benzylique [6] (Schéma 2.1). L'hydrogénolyse du groupement benzylique permet d'obtenir la β -lactone acide qui possède donc le groupement -COOH fonctionnalisable.⁹

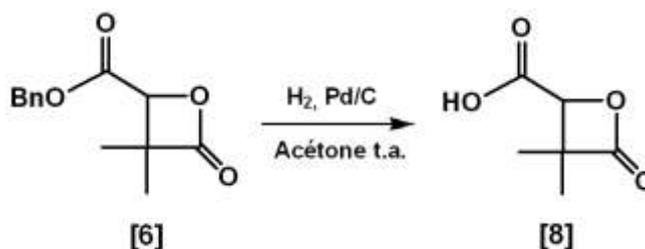


Schéma 2.1 : Synthèse de la β -lactone acide
Déprotection de la β -lactone benzylique [6] pour obtenir la β -lactone acide [8]

Pour la mise au point du greffage, le cholestérol est utilisé comme molécule modèle et la réaction est réalisée suivant le protocole d'estérification de Steglich. Le cholestérol n'étant pas un principe actif, il est utilisé uniquement dans le but de prouver la faisabilité de cette expérience. Sa structure chimique simple par rapport à celle des actifs réels permet une analyse plus aisée des données obtenues. De plus, le cholestérol ne possède qu'une seule fonction hydroxyle, la réaction aura donc lieu sur celle-ci^{10,11} pour donner le produit final, la β -lactone-cholestérol.

1.2. PDMMLAH_{40-co}-Hex₆₀, PDMMLA 40/60 [P4]

Les études précédentes sur différents dérivés de PDMMLA avec différents niveaux d'hydrophilie (10%, 20% et 30%) ont prouvé que le copolymère avec 30% de -COOH, le PDMMLA 30/70 [P7], présentait les meilleurs résultats concernant la cinétique de dégradation. En effet, le copolymère PDMMLA 30/70 [P7] se dégrade dans un laps de temps de six mois (Figure 2.1). Le copolymère 30/70 est également le dérivé de PDMMLA avec les propriétés physicochimiques et biologiques les plus intéressantes parmi les trois copolymères analysés.¹⁻³

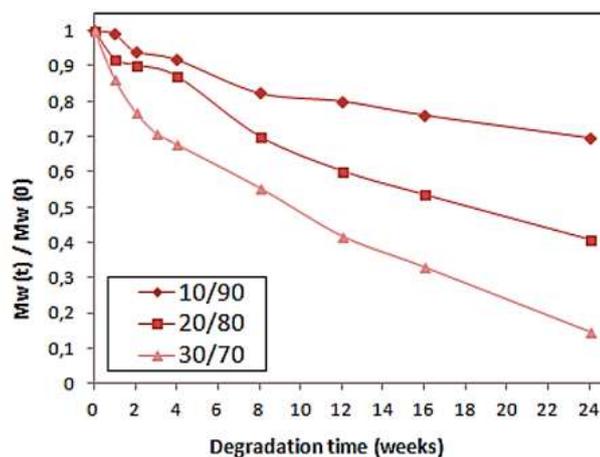


Figure 2.1 : Représentation graphique de la dégradation de trois dérivés de PDMMLA sur une période de six mois

[P5] : 10/90, [P6] : 20/80 et [P7] : 30/70. Le PDMMLA 30/70 [P7] montre la perte de masse la plus importante parmi les trois copolymères étudiés.¹

Afin d'accélérer davantage le processus de dégradation, la synthèse d'un nouveau copolymère de PDMMLA est envisagée. Le PDMMLAH_{40-co}-Hex₆₀ (PDMMLA 40/60) [P4] est donc synthétisé suivant le protocole de polymérisation des β -lactones. Grâce à la présence de plus de groupements -COOH, le PDMMLA 40/60 [P4] se dégraderait encore plus rapidement que le PDMMLA 30/70 [P7], limitant les complications post-implantatoires dues à la présence du polymère.

La stratégie est donc de greffer 10% d'un principe actif sur les 40% de -COOH du PDMMLA 40/60 [P4] afin de conserver les 30% de -COOH initialement recherchés, tout en accélérant la dégradation du polymère restant après la libération complète du principe actif. On utilise alors 0.1 équivalent de cholestérol ou de Paclitaxel (PTX) pour un équivalent de copolymère 40/60 (Figure 2.2).

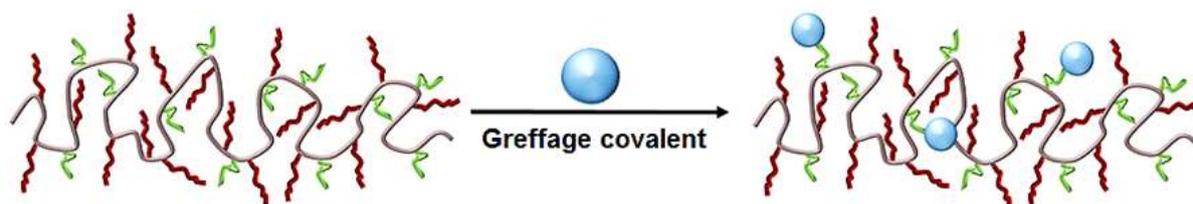


Figure 2.2 : Représentation schématique du principe du greffage covalent envisagé
Un principe actif greffé chimiquement sur le copolymère 40/60. Rouge : chaînes latérales d'ester hexyloxy, Vert : chaînes latérales d'acide carboxylique, Bleu : principe actif.

Les nouveaux polymères obtenus par greffage seront nommés PDMMLAH_{30-ter}-Chol_{10-ter}-Hex₆₀ ou PDMMLA-Chol 30/10/60 [P8] et PDMMLAH_{30-ter}-PTX_{10-ter}-Hex₆₀ ou PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10].

1.3. Homopolymère PDMMLA-H [P2]

Dans le but de déterminer la proportion maximale du greffage, l'homopolymère acide PDMMLA-H [P2] a été choisi pour faire la réaction d'estérification avec le cholestérol et le Paclitaxel. Cette expérience va donc permettre de comprendre l'importance de la contrainte stérique de la molécule greffée sur le pourcentage du greffage.

Dans ces réactions, un équivalent de cholestérol ou de Paclitaxel est utilisé pour un équivalent d'homopolymère PDMMLA-H, pour donner respectivement les produits finaux PDMMLA-Chol [P9] et PDMMLAH_{45-CO}-PTX₅₅ ou PDMMLA-PTX 45/55 [P11].

2. Méthodologie

Estérification de Steglich

Le protocole d'estérification de Steglich est utilisé dans cette étude pour créer une liaison covalente entre les polymères et les molécules hydroxylées. Cette méthode utilise un carbodiimide avec de la *N,N*-diméthyl-4-aminopyridine (DMAP) pour activer un acide carboxylique et permettre la formation d'un ester. Dans notre cas, l'estérification a lieu en impliquant la fonction acide carboxylique du monomère ou du polymère et la fonction hydroxyle disponible de la molécule à greffer. L'acide carboxylique est donc activé par l'action du *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), en formant l'intermédiaire *O*-acylisourée (schéma 2.2).¹²⁻¹⁴

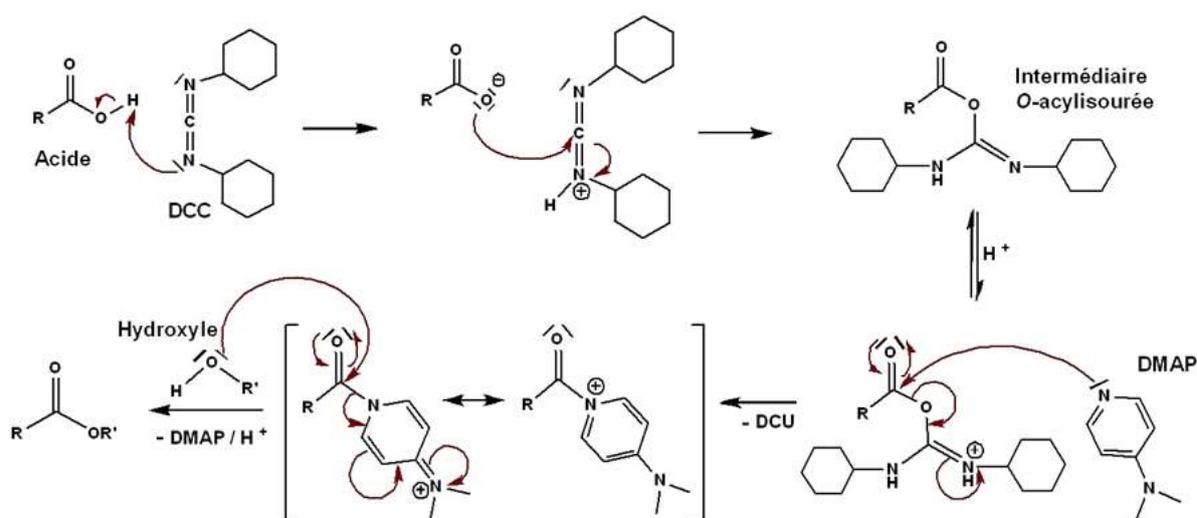


Schéma 2.2 : Mécanisme de l'estérification de Steglich

L'intermédiaire *O*-acylisourée est formé par l'action du DCC sur l'acide carboxylique. La nouvelle liaison ester est ensuite formée grâce à l'attaque de l'hydroxyle.

L'addition du DMAP en quantité catalytique est nécessaire pour améliorer l'estérification et minimiser la formation du sous-produit de migration acyle improductif, compétitif avec l'attaque nucléophile de l'hydroxyle.^{13,15}

Comme évoqué précédemment, la première réaction de greffage est réalisée en utilisant le cholestérol (figure 2.3) comme molécule modèle pour mettre en évidence la faisabilité du greffage covalent.

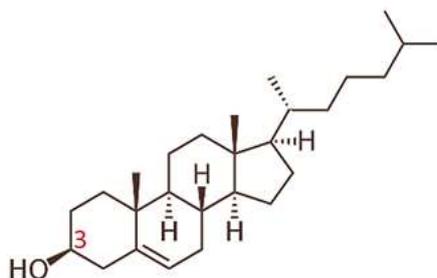


Figure 2.3 : Structure chimique du cholestérol

Le greffage covalent a lieu en impliquant le groupement hydroxyle sur le C₃.

Après la mise au point de la réaction, le greffage est réalisé en utilisant le Paclitaxel (figure 2.4), un principe actif couramment employé dans le traitement de nombreuses maladies. Selon la littérature, dans le cas du greffage du Paclitaxel en présence de DCC/DMAP, seul le groupement 2'-hydroxyle de la molécule est activé compte tenu de la réactivité plus importante de celui-ci comparé au 7-hydroxyle. Quant au groupement 1-hydroxyle, il ne présente pas une réactivité remarquable.¹⁶⁻¹⁸ Le mécanisme d'action du Paclitaxel a été détaillé dans la partie bibliographie (cf. page 44).

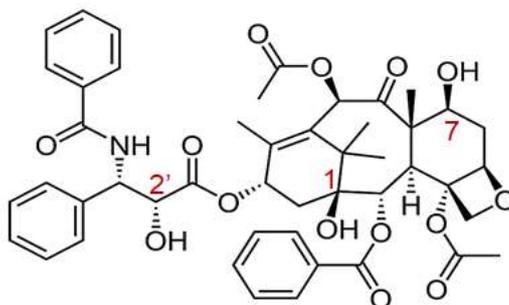


Figure 2.4 : Structure du Paclitaxel

Trois groupements hydroxyles sont présents sur les positions C₁, C₇ et C_{2'}.

3. Résultats et discussion

3.1. Réactions de greffage covalent par l'estérification de Steglich

3.1.1. Greffage du cholestérol

- 4-cholestéryloxy-carbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone-cholestérol)

La β -lactone acide [8], forme déprotégée de la lactone benzylique [6], est utilisée dans cette expérience afin de réaliser le greffage covalent du cholestérol. Après la réaction de déprotection, l'analyse des spectres RMN, ainsi que les résultats de l'analyse élémentaire ont permis de confirmer la composition chimique de la nouvelle β -lactone [8]. Le calcul du pourcentage molaire de chaque élément présent dans la molécule permet de confirmer la composition attendue. Les résultats expérimentaux sont en cohérence avec les valeurs théoriques calculées : $C_{Th} = 50.00\%$, $C_{Exp} = 49.86\%$, $H_{Th} = 5.58\%$, $H_{Exp} = 6.21\%$.

L'analyse du spectre RMN 1H du produit de greffage confirme la réaction *via* la modification des déplacements chimiques des groupements engagés dans la nouvelle liaison formée entre la β -lactone et le cholestérol. La figure 2.5 représente les spectres RMN 1H du cholestérol, de la β -lactone acide [8] et du produit de greffage, la β -lactone-cholestérol [9].

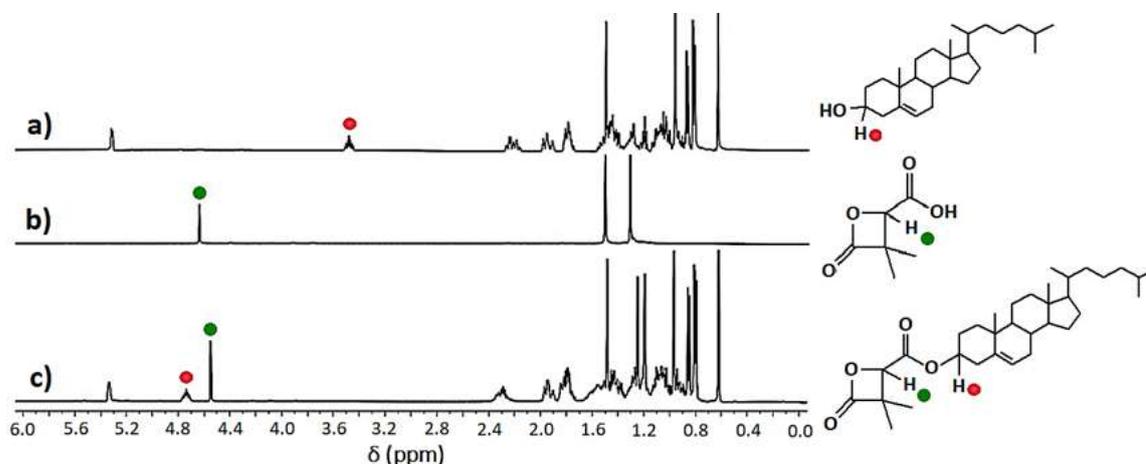


Figure 2.5 : Spectres RMN 1H du greffage covalent du cholestérol sur le monomère
a) Cholestérol, b) β -lactone acide [8], c) β -lactone-cholestérol [9]

Les signaux à 3.55 ppm (figure 2.5-a) et 4.67 ppm (figure 2.5-b) correspondent aux protons indiqués sur le cholestérol et la β -lactone [8] respectivement. Les changements dans les déplacements chimiques de ces groupes, intégrant chacun pour un proton montrent qu'une modification chimique a eu lieu sur ces molécules (figure 2.5-c). En effet, le proton sur le C_3 du cholestérol subit un déblindage vers 4.75 ppm après greffage, sous les effets électroniques inductif et mésomère attracteur de la nouvelle liaison ester formée.

L'analyse FT-IR des produits avant et après greffage confirme également la réaction. La bande de vibration d'élongation -OH du cholestérol (figure 2.6-a) à 3450 cm^{-1} disparaît complètement après le greffage, indiquant que le groupement hydroxyle a été transformé en ester. D'autre part, la bande d'absorption à 1222 cm^{-1} correspond à l'élongation C-O de la nouvelle liaison ester (figure 2.6-b).

Les résultats de l'analyse élémentaire permettent également de valider la composition chimique attendue de la β -lactone greffée [9]. En effet, les valeurs expérimentales obtenues dans le cas de la β -lactone-cholestérol donnent des résultats cohérents avec des valeurs théoriques calculées et valide la réaction d'estérification : $C_{Th} = 76.90\%$, $C_{Exp} = 76.32\%$ et $H_{Th} = 10.21\%$, $H_{Exp} = 10.43\%$.

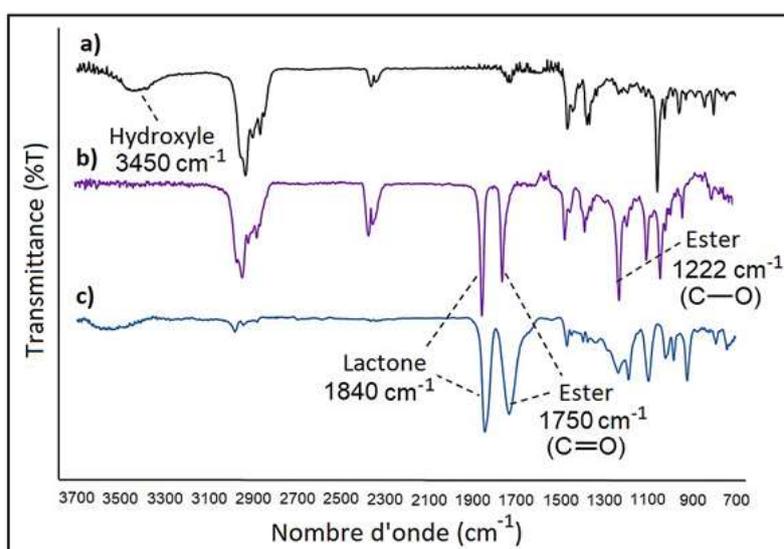


Figure 2.6 : Spectres FT-IR des produits avant et après greffage du cholestérol sur le monomère

a) cholestérol, b) β -lactone-cholestérol [9], c) β -lactone acide [8]

- **PDMMLAH_{30-ter}-Chol_{10-ter}-Hex₆₀ ou PDMMLA-Chol 30/10/60**

Concernant les polymères, les changements de déplacements chimiques sont différents de ceux du monomère, malgré les effets électroniques similaires. Cela peut s'expliquer par la différence de mobilité au sein du polymère. En effet, la chaîne polymère est plus souple et mobile comparée à la structure plane et rigide de la β -lactone. Dans le cas des polymères, les intégrations des pics permettent de calculer le pourcentage de greffage.

Pour le copolymère 40/60 [P4], le greffage de 10% de cholestérol par motif de répétition a été réalisé dans les mêmes conditions que dans le cas de la β -lactone [8]. Les calculs utilisant

les valeurs d'intégration des pics RMN ^1H du produit à 3.45 ppm (H_3 intégrant pour 0.09H) et 5.28 ppm (H_b et H_6 intégrant pour 1.11H), montrent que le cholestérol est présent à 10% sur le polymère greffé, comme souhaité (figure 2.7). Le terpolymère PDMMLAH_{30-ter}-Chol_{10-ter}-Hex₆₀ (PDMMLA-Chol 30/10/60) [P8] est ainsi obtenu et le greffage covalent est réalisé avec succès.

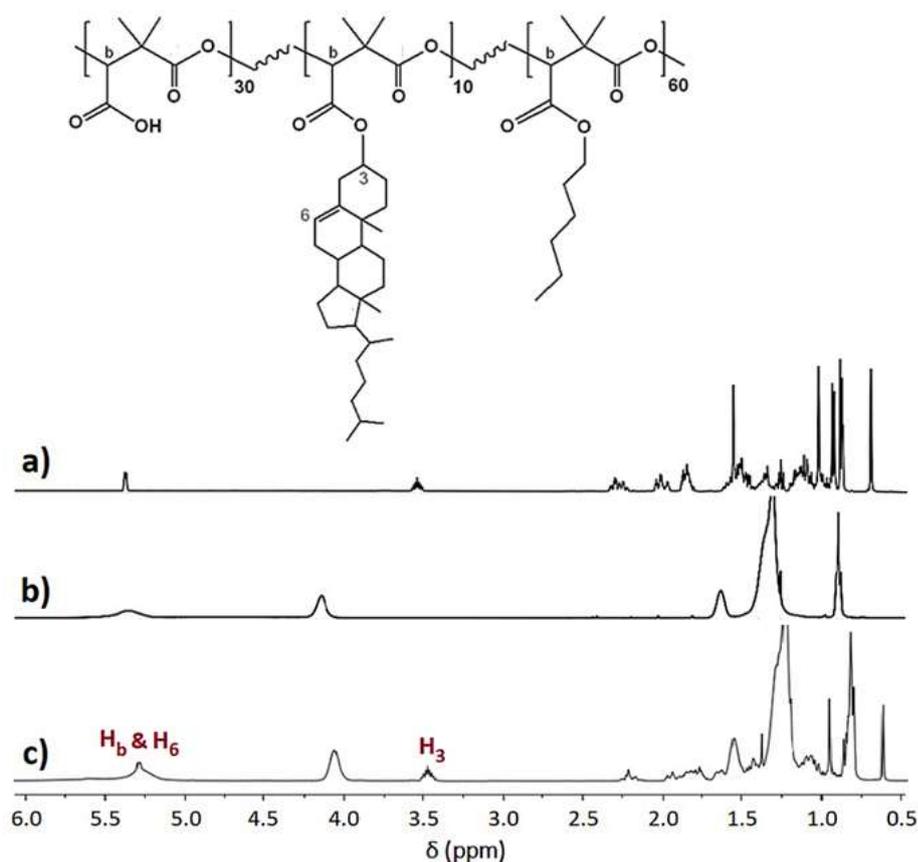


Figure 2.7: Nouveau terpolymère PDMMLA-Chol 30/10/60 et spectres RMN ^1H
a) cholestérol, b) PDMMLA_{40/60} [P4], c) PDMMLA-Chol 30/10/60 [P8]

• PDMMLA-Chol

Quant à l'homopolymère PDMMLA-H, un greffage à 100% de cholestérol a été effectué en utilisant un équivalent de cholestérol pour un équivalent d'homopolymère.

On peut observer en RMN ^1H 100% de greffage puisque les intégrations des pics à 3.40 ppm (H_3 sur le cholestérol) et à 5.23 ppm (H_b sur le polymère) sont de 1.04 et 1.05 respectivement (figure 2.8).

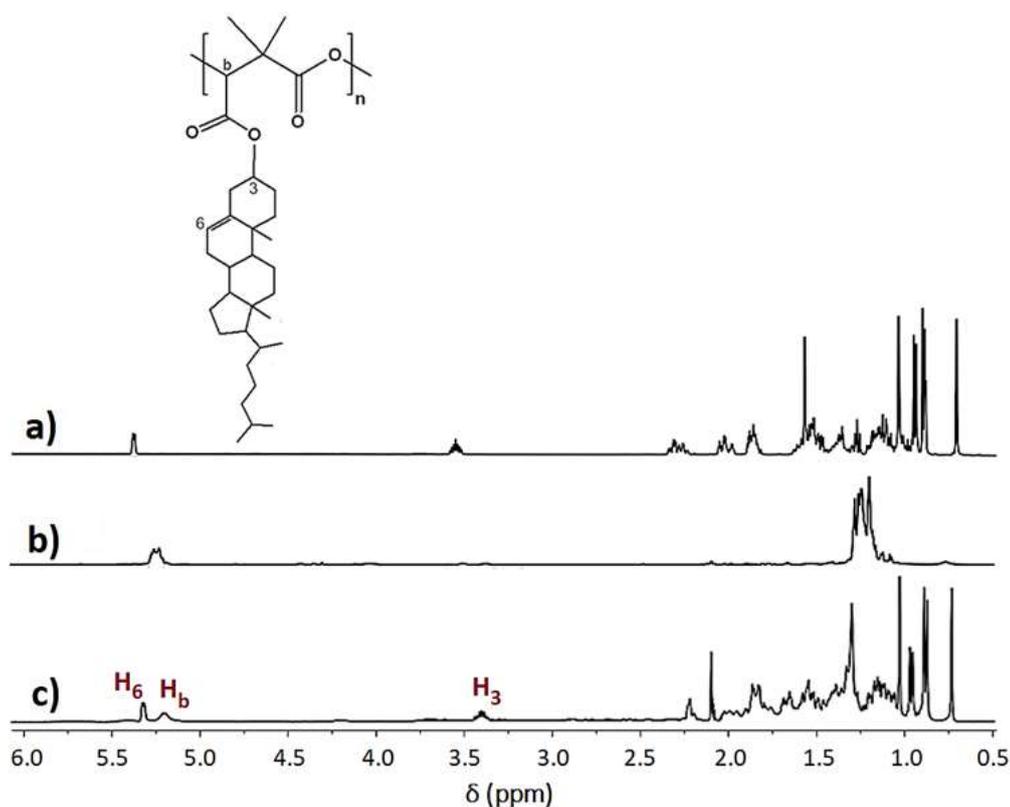


Figure 2.8 : Nouveau polymère PDMMLA-Chol et spectres RMN ^1H
 a) cholestérol, b) homopolymère PDMMLA-H [P2], c) PDMMLA-Chol [P9]

3.1.2. Greffage du Paclitaxel

- **Greffage du Paclitaxel sur la β -lactone acide**

La réaction de greffage sur la β -lactone acide a été également effectuée avec le Paclitaxel, dans le but d'élaborer une β -lactone-PTX. Bien que les conditions expérimentales soient identiques à celles de la β -lactone-cholestérol, cette dernière réaction n'a pas donné les résultats souhaités.

En effet, en analysant le spectre RMN ^1H du produit final, on observe un pic unique (singulet) intégrant pour 6H vers 1.3 ppm. Cela signifie que le cycle lactone a subi une ouverture lors de la réaction avec le Paclitaxel en présence de DCC/DMAP.

- **PDMMLAH_{30-ter}-PTX_{10-ter}-Hex₆₀ ou PDMMLA-PTX 30/10/60**

Le greffage du Paclitaxel sur le PDMMLA 40/60 [P4] est une étape primordiale, car le produit final de cette réaction est destiné à des applications dans le domaine biomédical et en particulier pour le revêtement de stents endovasculaires.

La figure 2.9 montre les spectres RMN ^1H du Paclitaxel, du PDMMLA 40/60 [P4] et du PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]. Les déplacements chimiques et les intégrations des pics confirment que le greffage par estérification a eu lieu impliquant le groupement 2'-hydroxyle du Paclitaxel et le groupement acide carboxylique du copolymère. Le pic à 3.55 ppm sur le spectre (a), correspondant au proton du groupe 2'-hydroxyle du Paclitaxel, disparaît après greffage (spectre c), indiquant que ce groupement fonctionnel a été transformé en un ester. En utilisant les valeurs d'intégrations des pics à 5.34 ppm (intégrant pour 1.32) et à 6.20 ppm (intégrant pour 0.12), on peut en déduire le rapport des groupements acide carboxylique libres et les groupements greffés sur les chaînes latérales du copolymère.

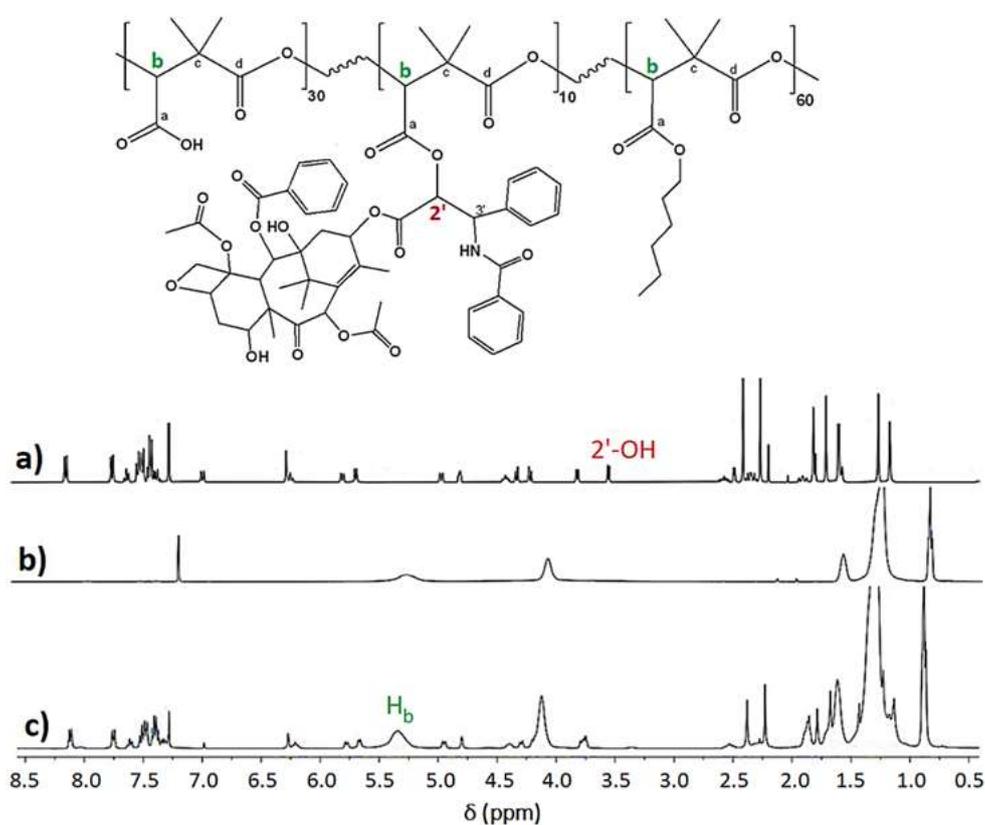


Figure 2.9 : Nouveau terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 et spectres RMN ^1H
a) Paclitaxel, b) PDMMLA 40/60 [P4], c) PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]

Les calculs confirment la structure chimique du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10], avec les 10% souhaités de Paclitaxel greffé.

Pour ce nouveau terpolymère qui nous intéresse tout particulièrement, les spectres RMN à deux dimensions ont également été enregistrés, permettant une analyse plus approfondie du produit final. La figure 2.10 représente le spectre 2D ^1H - ^1H du terpolymère [P10]. Il s'agit d'une séquence RMN homonucléaire, COSY pour « *CORrelation SPECTROSCOPY* » qui identifie

les protons couplés les uns aux autres au sein d'une molécule. En effet, sur un spectre COSY on observe sur la diagonale le reflet du spectre 1D de la molécule analysée, et des signaux symétriques de part et d'autre de la diagonale, correspondant aux couplages de paires de noyaux. Ces signaux croisés indiquent que deux noyaux de déplacements chimiques différents sont couplés.¹⁹

Dans le cas du terpolymère [P10], on constate que le proton H_b est couplé à lui-même *via* le pic sur la diagonale, et le proton H_{2'} est au proton H_{3'} qui se trouve au voisinage (³J) de ce dernier.

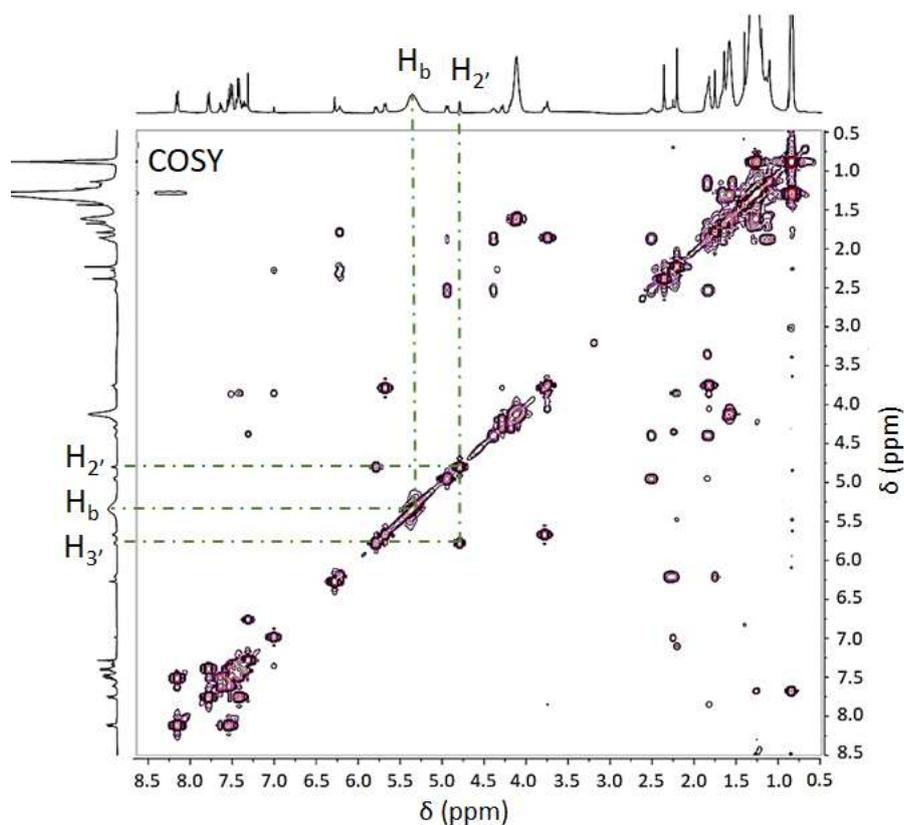


Figure 2.10 : Spectre COSY du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60

Le spectre COSY montre les corrélations ^1H - ^1H à travers les liaisons du terpolymère [P10].

Les figures 2.11 et 2.12 montrent respectivement deux autres spectres RMN 2D du nouveau terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60. Il s'agit d'un spectre HSQC ou « *Heteronuclear Single Quantum Correlation* » et d'un spectre HMBC ou « *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* ». Ces expériences RMN hétéronucléaires fournissent des preuves supplémentaires en plus de la RMN 1D afin de confirmer l'attribution de la résonance.

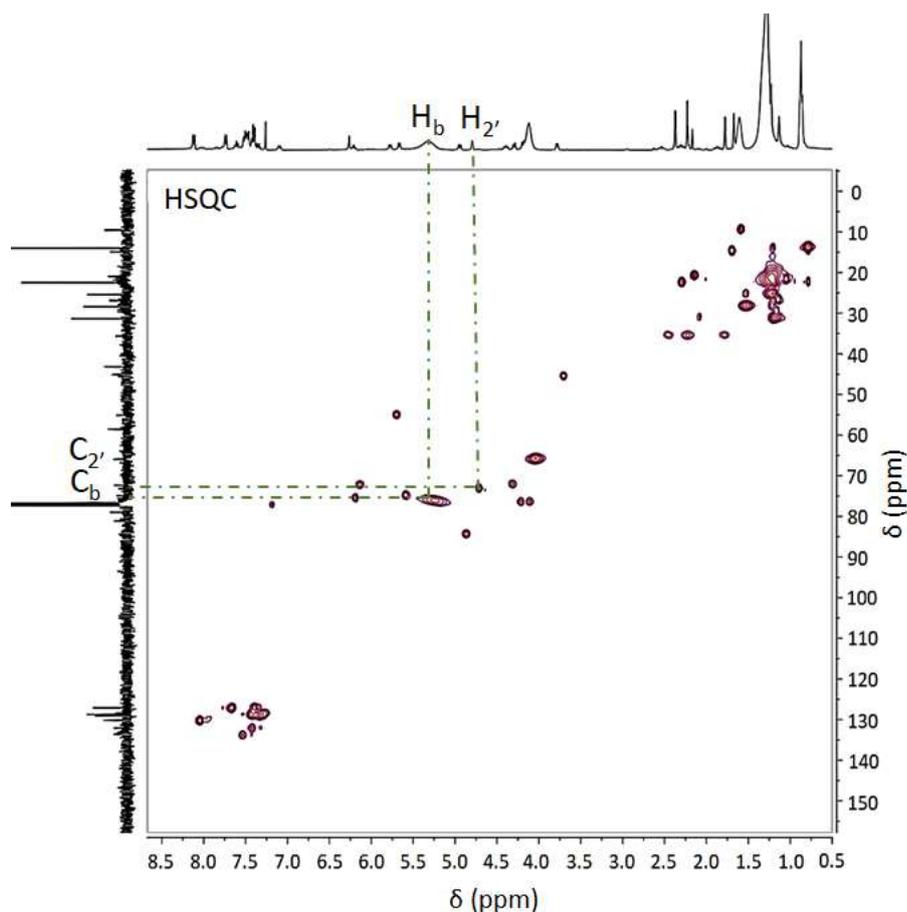


Figure 2.11 : Spectre hétéronucléaire HSQC du PDMMLA-PTX 30/10/60
La HSQC montre les corrélations directes entre deux noyau différents ($^1J_{C-H}$).

La méthode HSQC permet d'observer les corrélations directes 1J de deux noyaux différents, ici, le ^{13}C et le 1H . Nous pouvons voir sur la figure 2.11 le spectre HSQC du terpolymère **[P10]** qui montre les corrélations des protons $H_{2'}$ et H_b sur les carbones $C_{2'}$ et C_b respectivement.

La méthode HMBC, quant à elle, représente les corrélations entre un proton et un carbone séparés par plusieurs liaisons.

Dans le cas du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 **[P10]**, on observe sur le spectre (figure 2.12) une corrélation entre le $H_{2'}$ et le C_a qui sont séparés par trois liaisons. Les corrélations du proton H_b avec les carbones C_c (2J) et C_d (3J) sont également visibles.

Les groupements engagés dans la nouvelle liaison formée étant séparés par plusieurs liaisons, les spectres COSY et HSQC ne sont pas dans la mesure de montrer les corrélations entre ces derniers. Le spectre HMBC est alors enregistré afin de mettre en évidence la formation d'une nouvelle liaison entre le Paclitaxel et le copolymère **[P4]** avec la corrélation $^3J_{H_{2'}-C_a}$.

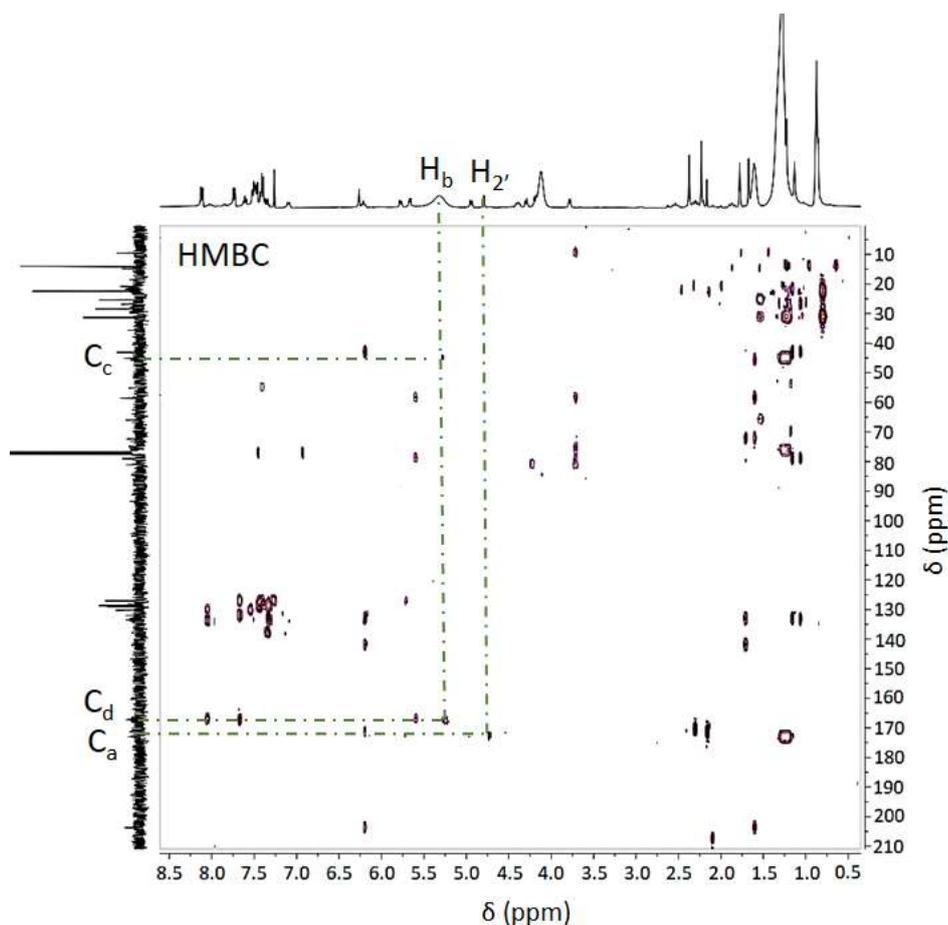


Figure 2.12 : Spectre hétéronucléaire HMBC du PDMMLA-PTX 30/10/60
 La HMBC représente les corrélations ^1H - ^{13}C à travers plusieurs liaisons.

- **PDMMLA-PTX 45/55**

Dans le cas de l'homopolymère **[P2]**, les signaux RMN ^1H observés des groupements mentionnés précédemment ($\text{H}_{2'}$ et H_b), indiquent qu'il reste 45% de groupements $-\text{COOH}$ libres sur le PDMMLA greffé (figure 2.13). Cela implique que le pourcentage de greffage maximal du Paclitaxel sur l'homopolymère est limité à environ 55%.

On peut expliquer ce phénomène par la structure chimique plus encombrée du Paclitaxel, comparée à celle du cholestérol. En effet, la gêne stérique générée par le Paclitaxel, limite son accès à la totalité des groupements $-\text{COOH}$ du polymère. Le pourcentage du greffage n'est alors pas de 100% malgré l'utilisation d'un équivalent de Paclitaxel pour un équivalent de polymère. On obtient donc le copolymère $\text{PDMMLA}_{45\text{-CO}}\text{-PTX}_{55}$ (PDMMLA-PTX 45/55) **[P11]**.

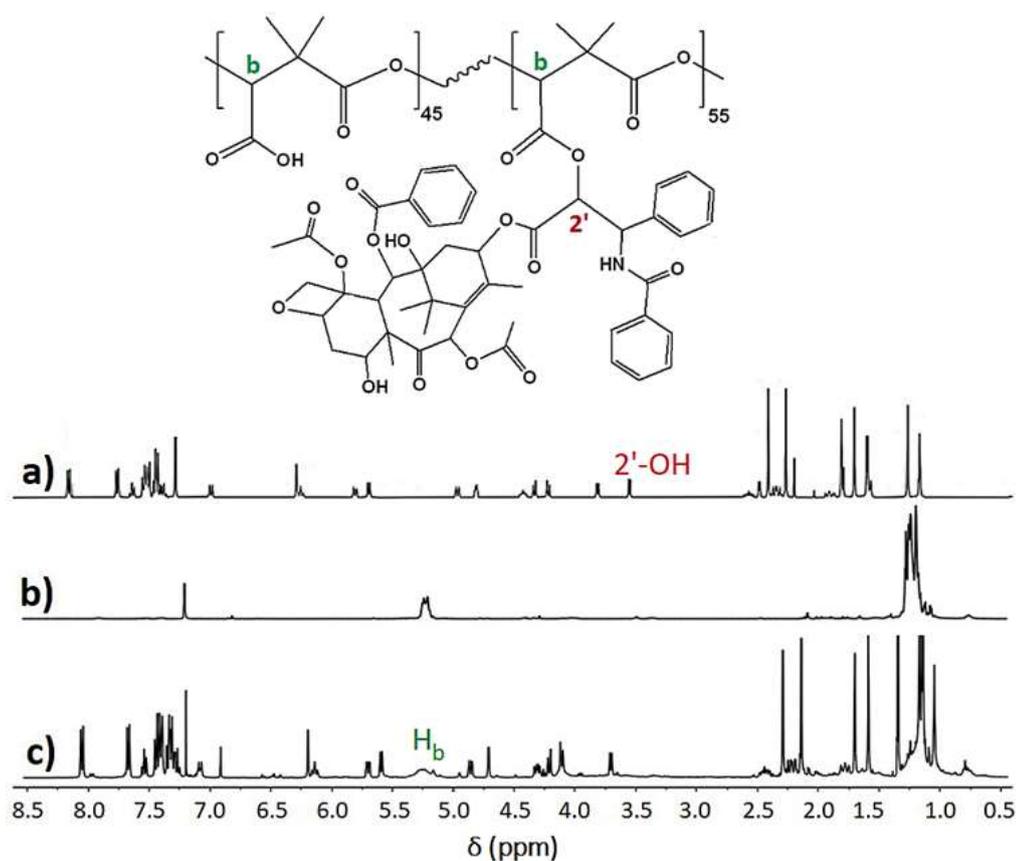


Figure 2.13 : Nouveau copolymère PDMMLA-PTX 45/55 et spectres RMN ^1H
 a) Paclitaxel, b) PDMMLA-H [P2], c) PDMMLA-PTX 45/55 [P11].

3.2. Analyses thermogravimétriques

Une fois le protocole du greffage covalent mis en place, les analyses thermogravimétriques (TGA) des polymères avant et après greffage ont été effectuées afin de comparer les résultats et de valider le changement des propriétés diverses des polymères greffés par rapport aux polymères de départ.

L'analyse thermogravimétrique (TGA) d'un polymère permet d'obtenir des informations sur sa stabilité thermique et sur sa température de dégradation T_d .²⁰

Les données recueillies par la technique de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) fournissent des informations sur les propriétés thermiques du polymère, principalement la température de transition vitreuse T_g et la température de fusion T_f .^{21,22} Les dérivés de PDMMLA étant des polymères amorphes, ils sont caractérisés par la T_g et ne présentent pas de T_f .

La figure 2.14 présente les courbes de TGA des polymères avant et après greffage du cholestérol et du Paclitaxel. On peut observer le début de la dégradation thermique de chacun

des polymères entre 170 et 200°C. Cette dégradation est reflétée par une perte de la masse résiduelle de l'échantillon étudié. Dans notre cas, la dégradation complète des polymères est observée entre 270 et 320°C.

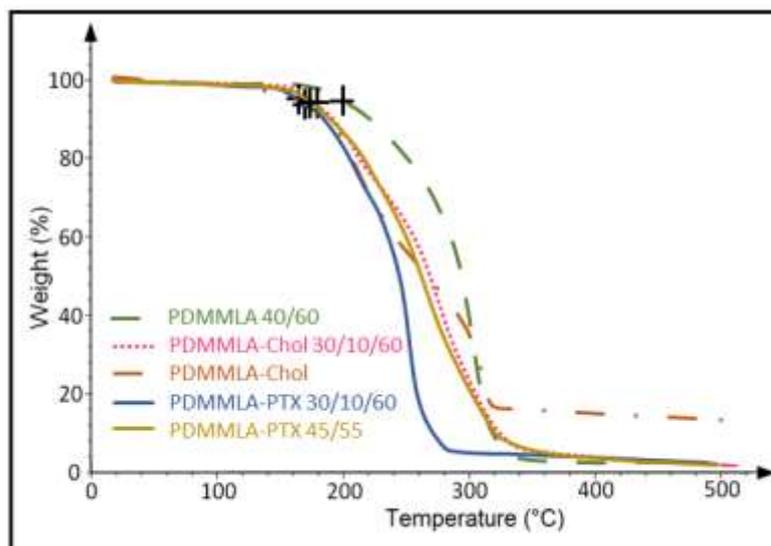


Figure 2.14 : Courbes de TGA des dérivés de PDMMLA avant et après greffage chimique du cholestérol et du Paclitaxel

Les points indiqués sur les courbes présentent le début de la dégradation thermique des polymères. A ce stade, la perte de masse résiduelle est de l'ordre de 5%.

Les tracés DSC des polymères sont représentés dans la figure 2.15. On constate un changement de T_g dans le cas du greffage du cholestérol sur le PDMMLA 40/60 [P4] ainsi que sur le PDMMLA-H [P2]. La T_g augmente de 23.7°C à 25.7°C après le greffage de 10% de cholestérol sur le copolymère et de 69.9°C à 106.06°C après le greffage sur l'homopolymère.

Après le greffage de 10% de Paclitaxel sur le copolymère 40/60, on observe une augmentation de la T_g de 23.7°C à 34.7°C. En revanche, dans le cas de l'homopolymère PDMMLA-H, la T_g subit une légère diminution en passant de 69.9°C à 64.5°C.

Dans le cas du monomère analysé séparément, le greffage du cholestérol sur la β -lactone acide [8] entraîne une augmentation de la T_f de 48°C à 160°C.

La T_d et la T_g sont des propriétés thermiques importantes dans l'élaboration d'un biomatériau car elle détermine l'état physique du polymère. Dans le cas de notre étude, on observe une T_d élevée pour tous les polymères avant et après greffage. Cela présente l'avantage de pouvoir manipuler les polymères à des températures élevées si nécessaire, sans être contraint par une dégradation thermique. D'autre part, la T_g est le facteur déterminant de l'état physique du polymère qui est rigide et vitreux en-dessous de la T_g et souple et caoutchouteux au-dessus de cette température. Une T_g inférieure à 37°C indique que le polymère sera dans son état souple

à température corporelle et qu'il n'aura pas de changement d'état après son implantation dans le corps. Par conséquent le PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] présente une T_g adaptée de 34.7°C pour les applications biomédicales.

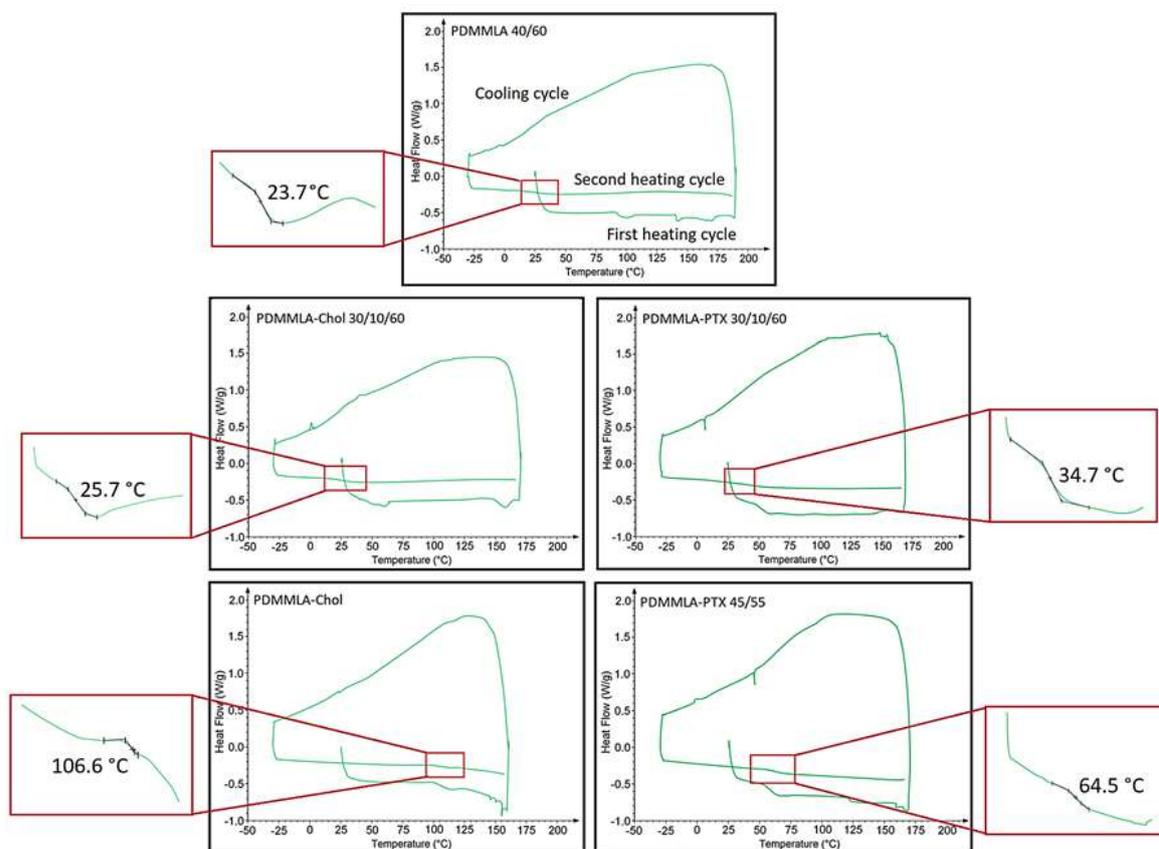


Figure 2.15 : Thermogrammes DSC des dérivés de PDMMLA avant et après greffage
Les cycles de chauffage et refroidissement des dérivés de PDMMLA étudiés par la DSC.

Les valeurs de T_d et T_g obtenues lors des expériences de TGA et DSC sont regroupées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : T_f des β -lactones et T_d et T_g des dérivés de PDMMLA avant et après greffage covalent du cholestérol et du Paclitaxel.

	T_d ($^\circ\text{C}$)	T_g ($^\circ\text{C}$) ^a	T_f ($^\circ\text{C}$)
β -lactone acide	-	-	48
β -lactone-Chol	-	-	160
PDMMLA 40/60	198.1	23.7	-
PDMMLA-H	Non-déterminée	69.9 ^b	-
PDMMLA-Chol 30/10/60	178.1	25.7	-
PDMMLA-Chol	163.2	106.6	-
PDMMLA-PTX 30/10/60	168.8	34.7	-
PDMMLA-PTX 45/55	170.1	64.53	-

^a T_g mesurée par DSC lors du second cycle de chauffe

^b T_g tirée du manuscrit de thèse de R. Belibel (2015).²³

4. Conclusion

La synthèse à façon des dérivés de PDMMLA permet d'obtenir des copolymères amphiphiles grâce à l'utilisation des groupements latéraux ester hexylique (-COOHex) et acide carboxylique (-COOH). Les groupements -COOH étant chimiquement modifiables, il est possible d'envisager un greffage covalent de molécules sur ces derniers, comme des principes actifs.

Le protocole d'estérification de Steglich nous a permis de réaliser une réaction de greffage covalent de deux molécules sur des dérivés de PDMMLA, en utilisant dans un premier temps le cholestérol comme molécule modèle, puis le Paclitaxel comme principe actif utilisé dans le traitement de plusieurs pathologies.

Dans le cas du cholestérol, l'ensemble des résultats obtenus confirme bien le greffage chimique de ce dernier aussi bien sur les polymères que sur le monomère. L'analyse des spectres RMN ^1H des polymères finaux permet de confirmer et de quantifier le pourcentage de greffage. Les calculs basés sur les intégrations des signaux RMN ^1H montrent que le cholestérol a été greffé sur le PDMMLA 40/60 à 10%, et sur l'homopolymère PDMMLA-H à 100%. En effet, le cholestérol possède une structure chimique adéquate pour permettre un greffage à 100% sur l'homopolymère.

Le greffage du Paclitaxel sur les polymères est également réalisé avec succès. Contrairement au cholestérol, dans le cas de l'homopolymère, le pourcentage du greffage n'est pas de 100%, compte tenu de la structure encombrée du Paclitaxel.

Parmi les produits étudiés dans ce chapitre, le nouveau terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [**P10**] a une importance particulière, car son élaboration vise une utilisation biomédicale, notamment comme revêtement de stents. L'analyse par RMN de ce polymère a permis d'observer en ^1H , la disparition du pic du groupement 2'-OH du Paclitaxel après greffage, et avec des expériences 2D HMBC, la corrélation du proton H_2' avec le C_a (3J).

Après la mise en place du greffage covalent du Paclitaxel sur le PDMMLA 40/60, il est nécessaire d'étudier les propriétés diverses de ce nouveau terpolymère. Les études thermogravimétriques nous ont permis de déterminer la T_d et la T_g des polymères avant et après greffage. Tous les polymères présentent une température de dégradation au-dessus de 160°C , ce qui indique qu'ils peuvent être travaillés facilement sans subir une dégradation thermique. La température de transition vitreuse du PDMMLA-PTX 30/10/60 est de 34.7°C , ce qui implique que le polymère souple à 37°C et ne montrera pas de changement d'état une fois introduit dans l'organisme.

Nous aborderons dans le chapitre suivant, les études des propriétés physicochimiques de la surface, de la libération *in vitro* du Paclitaxel greffé, ainsi que du comportement des cellules HUVECs vis-à-vis du copolymère PDMMLA 40/60 [P4], du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et du PLA.

Références

- [1] R. Belibel, N. Marinval, H. Hlawaty, C. Barbaud, “Poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells” *Polym. Degrad. Stab.* 130, 288–299, **2016**.
- [2] R. Belibel, C. Barbaud, L. Mora, “Dynamic contact angle cycling homogenizes heterogeneous surfaces” *Mater. Sci. Eng. C.* 69, 1192–1200, **2016**.
- [3] R. Belibel, S. Sali, N. Marinval, A. Garcia-Sanchez, C. Barbaud, H. Hlawaty, “PDMMLA derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Physicochemical and biological evaluation” *Mater. Sci. Eng. C.* 117, 111284, **2020**.
- [4] L. McKeen, “Renewable Resource and Biodegradable Polymers” *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers*. chapter 14, 449-479, **2012**.
- [5] Y. Chen, L. Tan, L. Chen, Y. Yang, X. Wang, “Study on biodegradable aromatic/aliphatic copolyesters” *Brazilian J. Chem. Eng.* 15 (2), 321–335, **2008**.
- [6] N. Nagata, T. Nakahara, T. Tabuchi, R. Morita, J. R. Brewer, S. Fujishige, “Characterization of poly(β -L-malic acid) produced by *aureobasidium* sp. a-91” *Polymer Journal.* 25 (6), 585–592, **1993**.
- [7] R. Belibel, I. Azzouz, C. Barbaud, “Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((S)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 54 (11), 1495–1507, **2016**.
- [8] G. Hu, T. Lin, S. Du, R. Fu, M. Rao, Q. Yin, T. Huang, Y. Wang, “Design, preparation and performance of a novel drug-eluting stent with multiple layer coatings” *Biomater. Sci.* 5 (9), 1845–1857, **2017**.
- [9] E. Gholizadeh, R. Belibel, T. Bachelart, C. Bounadji, C. Barbaud, “Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications” *RSC Adv.* 10, 32602–32608, **2020**.
- [10] R. K. Mann, P. A. Beachy, “Cholesterol modification of proteins” *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1529 (1-3), 188-202, **2000**.
- [11] F. Schmidt, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer, B. König, “Synthesis of new Water-soluble cholesterol derivatives” *Synth. Commun.* 41 (19), 2876–2887, **2011**.
- [12] S. J. Gilles, V. Vieira, M. A. Lacerda, V. Castro, E. V. R. Santos, R. B. Orestes, E. Carneiro, J. W. M. Greco, “A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: Synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil” *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (1), 74–83, **2015**.
- [13] A. B. Lutjen, M. A. Quirk, A. M. Barbera, E. M. Kolonko, “Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification” *Bioorganic Med. Chem.* 26 (19), 5291–5298, **2018**.
- [14] K. Molnár, J. Behra, L. Takács, M. Kádár, Z. Kardos, F. Faigl, “A Convenient Procedure for the Synthesis of 2,2,2-Trifluoroethyl Methyl 2-Oxoalkylphosphonates” *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* 190 (5–6), 677–680, **2015**.

- [15] B. Neises, W. Steglich, “Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids” *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 17 (7), 522–524, **1978**.
- [16] C. Yu, Y. Zou, J. Yu, L. Ji, W. Li, Y. Law, W. C. Cheng, “Functional polylactide-g-paclitaxel-poly(ethylene glycol) by azide-alkyne click chemistry” *Macromolecules*. 44 (12), 4793–4800, **2011**.
- [17] K. L. Zhang, S. Zou, J. Elsabahy, M. Karwa, A. Li, A. Moore, D. A. Dorshow, R. B. Wooley, “Poly(ethylene oxide)-block-polyphosphester-based paclitaxel conjugates as a platform for ultra-high paclitaxel-loaded multifunctional nanoparticles” *Chem. Sci.* 4 (5) 2122–2126, **2013**.
- [18] M. Skwarczynski, Y. Hayashi, Y. Kiso, “Paclitaxel prodrugs: Toward smarter delivery of anticancer agent” *Journal of Medicinal Chemistry*. 49 (25), 7253-7269, **2006**.
- [19] Z. Szakács, Z. Sánta, “NMR Methodological Overview” *Anthropic Awareness: The Human Aspects of Scientific Thinking in NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry*. 257-289, **2015**.
- [20] S. El-Sayed, K. H. Mahmoud, A. A. Fatah, A. Hassen, “DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends” *Phys. B Condens. Matter*. 406 (21), 4068–4076, **2011**.
- [21] N. A. Grunina, T. V. Belopolskaya, G. I. Tsereteli, “The glass transition process in humid biopolymers. DSC study” *J. Phys. Conf. Ser.* 40, 105–110, **2006**.
- [22] B. Gornicka, L. Gorecki, “TGA/DTG/DSC investigation of thermal ageing effects on polyamide-imide enamel” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 101 (2), 647-650, **2010**.
- [23] R. Belibel, “Synthèse et caractérisations de nouveaux polyesters biodégradables dérivés du poly(acide3,3-diméthylmalique) comme revêtement prometteur de stents cardiovasculaires” *Thesis Manuscript*, **2015**.

Chapitre 3 : Études de surface des polymères, de la libération du Paclitaxel et du comportement des cellules HUVECs

Introduction

La possibilité de réaliser un greffage chimique de molécules sur le PDMMLA permet d'obtenir un nouveau type de biopolymère fonctionnalisé par un principe actif. Cela présente un intérêt majeur pour les applications biomédicales, en particulier pour le revêtement des stents, puisqu'il évitera l'utilisation de multicouches de polymère/principe actif (ex : PLA, PLGA) et permettra une libération constante du médicament dans l'organisme après implantation. Néanmoins, l'élaboration d'un tel revêtement nécessite davantage d'analyses physicochimiques et de connaissances sur son comportement vis-à-vis des conditions physiologiques *in vitro* et *in vivo* avant d'être validé comme biomatériau.

Ce chapitre rassemble donc une série d'études effectuées sur les nouveaux dérivés de PDMMLA, le copolymère 40/60 [P4] et le terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]. Pour une analyse comparative avec nos résultats, les expériences sont également menées sur le PLA, le polymère le plus utilisé comme revêtement de stents. Ce chapitre est donc constitué de trois parties, qui abordent les études d'adhésion protéique, de la libération du Paclitaxel et du comportement cellulaire des HUVECs.

Pour la première partie, qui consiste à étudier l'adhésion protéique sur la surface de ces trois polymères, les expériences sont réalisées grâce à la technique de DCA dans les conditions identiques à celles décrites dans le chapitre 1. Une comparaison est ainsi effectuée entre les profils d'adhésion des différentes protéines sur les surfaces des PDMMLAs et celle du PLA. Cette analyse permet en outre de constater les changements des profils d'adhésion du PDMMLA 40/60 après le greffage chimique du Paclitaxel.

En parallèle, dans le but d'analyser la rugosité de surface des polymères, le revêtement des stents, ainsi que des plaques métalliques en cobalt-chrome (Co-Cr), a été réalisé par la technique de *dip coating*. Pour une étude complémentaire et comparative, la technique de *spin coating* a été employée dans le revêtement des plaques. Ces expériences permettent de déterminer la rugosité de surface des films polymères déposés par deux techniques, ainsi que l'épaisseur du film formé dans les deux cas. Le stent est observé par microscopie optique avant et après revêtement par le terpolymère.

Après la réalisation du greffage covalent du Paclitaxel sur le copolymère PDMMLA 40/60 [P4], une étude de la libération de ce dernier devient nécessaire. La deuxième partie de ce chapitre comporte donc une étude *in vitro* de la cinétique de libération du Paclitaxel à partir du polymère greffé, PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]. Cette expérience est effectuée dans le PBS (1x) en présence et en absence des enzymes estérase et lipase, afin de comparer le profil

des courbes de libération correspondant à chaque cas. La libération est suivie par HPLC en phase inverse, en détectant par UV le Paclitaxel à 227 nm.

Enfin, la troisième partie consiste à étudier *in vitro* le comportement des cellules endothéliales humaines HUVECs au contact des trois polymères et la réponse cellulaire. Afin d'évaluer la cytotoxicité des polymères, et en particulier du terpolymère [P10], un test de viabilité par un dosage de LDH est effectué. En parallèle, une étude d'étalement des HUVECs est également pratiquée sur les trois polymères afin de constater leur affinité aux différentes surfaces.

1. Études de surface des polymères

1.1. Étude de l'adhésion protéique

Dans cette partie, une étude de l'adhésion des protéines est effectuée sur la surface du copolymère PDMMLA 40/60 [P4], du terpolymère PDMMLA 30/10/60 [P10] et du PLA.

Les conditions expérimentales de cette étude sont identiques à celles décrites précédemment dans le chapitre 1. Les expériences sont réalisées tout d'abord en faisant l'expérience du blanc en mesurant la force « F » à l'immersion dans le PBS seul. Ensuite, la force est mesurée à l'immersion dans une solution protéique pour l'adsorption, puis dans le PBS pour la désorption (rinçage). Les protéines étudiées sont également la BSA, la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine, le protéoglycane transmembranaire syndécan-4 et un mélange de toutes les protéines « Mix ».

L'étude des profils d'adhésions des protéines sur le PLA est réalisée afin de comparer les valeurs de F entre ce dernier et les polymères [P4] et [P10]. Ainsi, l'ensemble des résultats permettra d'observer les effets de la modification chimique du PDMMLA 40/60 sur l'adhésion des protéines à la surface de ce polymère. Cela permettra également de comparer les profils d'adhésion du terpolymère PDMMLA 30/10/60 [P10], un candidat pour les applications biomédicales, à ceux du PLA, un polymère biodégradable approuvé.

- **Expérience du blanc**

Dans cette expérience, réalisée en effectuant les cycles d'immersion/émersion dans le PBS, nous avons obtenu les courbes de F pour les trois polymères étudiés (figure 3.1). On constate que le PDMMLA 40/60 présente des valeurs moyennes de F bien plus élevées que le PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et le PLA, avec $F_{40/60}^{PBS} = 5.14 \pm 0.06$ mN. D'autre part, les courbes du PLA et du terpolymère sont très proches, presque superposées, avec $F_{30/10/60}^{PBS} = 0.95 \pm 0.01$ mN et $F_{PLA}^{PBS} = 1.02 \pm 0.11$ mN après stabilisation des valeurs ($p > 0.05$).

L'écart important entre les deux dérivés de PDMMLA avant et après le greffage ($\Delta F = 4.20 \pm 0.04$ mN) montre que la surface du polymère devient bien plus hydrophobe en présence du Paclitaxel, de telle manière que l'hydrophilie de surface du polymère greffé s'approche considérablement de celle du PLA, connu pour avoir une nature hydrophobe.

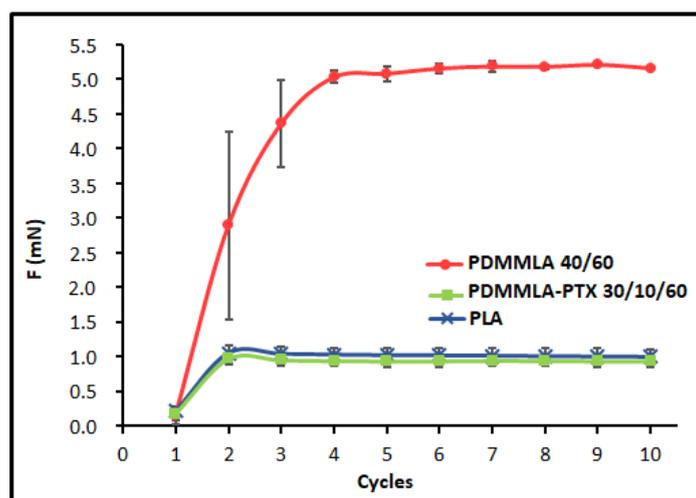


Figure 3.1 : Courbes de l'expérience du blanc des polymères PDMMLA 40/60 [P4], PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et PLA
La force F est mesurée à l'immersion des polymères dans le PBS ; (n = 3)

Les profils du blanc de tous les polymères étudiés dans ce projet sont présentés dans la figure 3.2. Trois catégories de polymères sont observées en termes d'hydrophilie de surface.

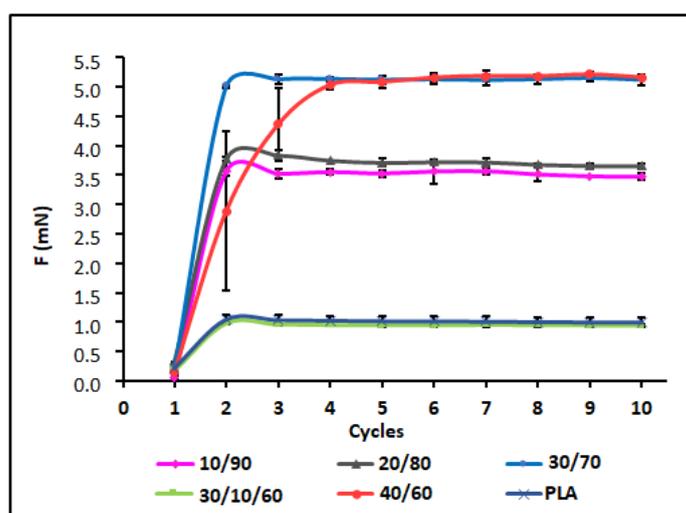


Figure 3.2 : Courbes de l'expérience du blanc de tous les polymères étudiés dans le PBS
PDMMLA 10/90 [P5], PDMMLA 20/80 [P6], PDMMLA 30/70 [P7], PDMMLA 40/60 [P4], PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et PLA ; (n = 3)

Les courbes des copolymères 30/70 [P7] et 40/60 [P4] (les plus hydrophiles) se rapprochent considérablement après la stabilisation des cycles et sont presque superposées : $F_{30/70}^{PBS} = 5.11 \pm 0.04$ mN et $F_{40/60}^{PBS} = 5.14 \pm 0.06$ mN.

D'autre part, les courbes du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et du PLA sont très proches et présentent une valeur de F autour de 1 mN. L'hydrophobie de surface du copolymère 40/60 augmente avec le greffage covalent du Paclitaxel et se rapproche de celle du PLA.

Les courbes des copolymères 10/90 [P5] et 20/80 [P6] quant à elles, suivent une tendance intermédiaire entre les plus hydrophiles et les plus hydrophobes des polymères étudiés (F entre 3.5 et 4 mN).

• Adsorption/désorption des protéines

La figure 3.3 présente les profils d'adhésion des protéines sur les surfaces du PDMMLA 40/60, du PDMMLA-PTX 30/10/60 et du PLA.

Dans le cas du copolymère 40/60, les valeurs de F obtenues en présence des protéines sont inférieures à celle du PBS avec un écart important. En effet, les valeurs moyennes de F pour toutes les protéines, se situent entre 1.0 et 1.5 mN à l'adsorption et au rinçage. Cela signifie que l'adhésion des protéines sur la surface du PDMMLA 40/60 rend la surface plus hydrophobe qu'au départ. Les valeurs de F pour toutes les protéines sont proches de celles de l'expérience « Mix », où toutes les protéines sont présentes, impliquant qu'elles présentent une affinité similaire à cette surface.

Globalement, les valeurs de F à l'adsorption et au rinçage varient entre 0.80 et 1.30 mN dans le cas des trois polymères (une différence de 0.50 mN entre la valeur de F la plus élevée et la plus faible).

L'adsorption et la désorption du syndécan-4 suit une tendance similaire aux autres protéines sur les trois surfaces ; $F_{Ads(40/60)}^{SDC-4} = 1.10 \pm 0.01$ mN, $F_{Des(40/60)}^{SDC-4} = 1.22 \pm 0.03$ mN ($\Delta F_{Ads(40/60)}^{SDC-4} = -4.05$ mN, $\Delta F_{Des(40/60)}^{SDC-4} = -3.92$ mN), $F_{Ads(30/10/60)}^{SDC-4} = 0.81 \pm 0.01$ mN, $F_{Des(30/10/60)}^{SDC-4} = 0.89 \pm 0.003$ mN ($\Delta F_{Ads(30/10/60)}^{SDC-4} = -0.12$ mN, $\Delta F_{Des(30/10/60)}^{SDC-4} = -0.05$ mN) et $F_{Ads(PLA)}^{SDC-4} = 0.83 \pm 0.03$ mN, $F_{Des(PLA)}^{SDC-4} = 0.91 \pm 0.01$ mN ($\Delta F_{Ads(PLA)}^{SDC-4} = -0.19$ mN, $\Delta F_{Des(PLA)}^{SDC-4} = -0.10$ mN) ; ΔF étant la différence de F entre l'adsorption/désorption et le blanc.

Le comportement global des protéines est déterminé par la courbe « Mix », qui reste majoritairement au même niveau que les courbes individuelles de toutes les protéines dans les trois cas et proche de la ligne de base pour le PDMMLA-PTX 30/10/60 et pour le PLA

$$(\Delta F_{Ads(30/10/60)}^{Mix} = -0.02 \text{ mN}, \Delta F_{Des(30/10/60)}^{Mix} = 0.001 \text{ mN}, \Delta F_{Ads(PLA)}^{Mix} = -0.13 \text{ mN}, \Delta F_{Des(PLA)}^{Mix} = 0.18 \text{ mN}).$$

Dans le cas des polymères PDMMLA-PTX 30/10/60 et PLA, on retrouve toutes les courbes d'adsorption et de rinçage des protéines concentrées autour de la courbe du PBS avec des légers écarts. Ces résultats montrent que le greffage covalent du Paclitaxel sur le copolymère 40/60 apporte un changement considérable aux propriétés de surface du polymère. Des profils similaires sont observés pour le PDMMLA-PTX 30/10/60 et le PLA, ce qui indique que le nouveau terpolymère destiné à l'utilisation biomédicale a des propriétés semblables à celles du PLA. Ce rapprochement de résultats donne un premier aperçu encourageant des propriétés de surface du terpolymère en termes d'adhésion protéique.

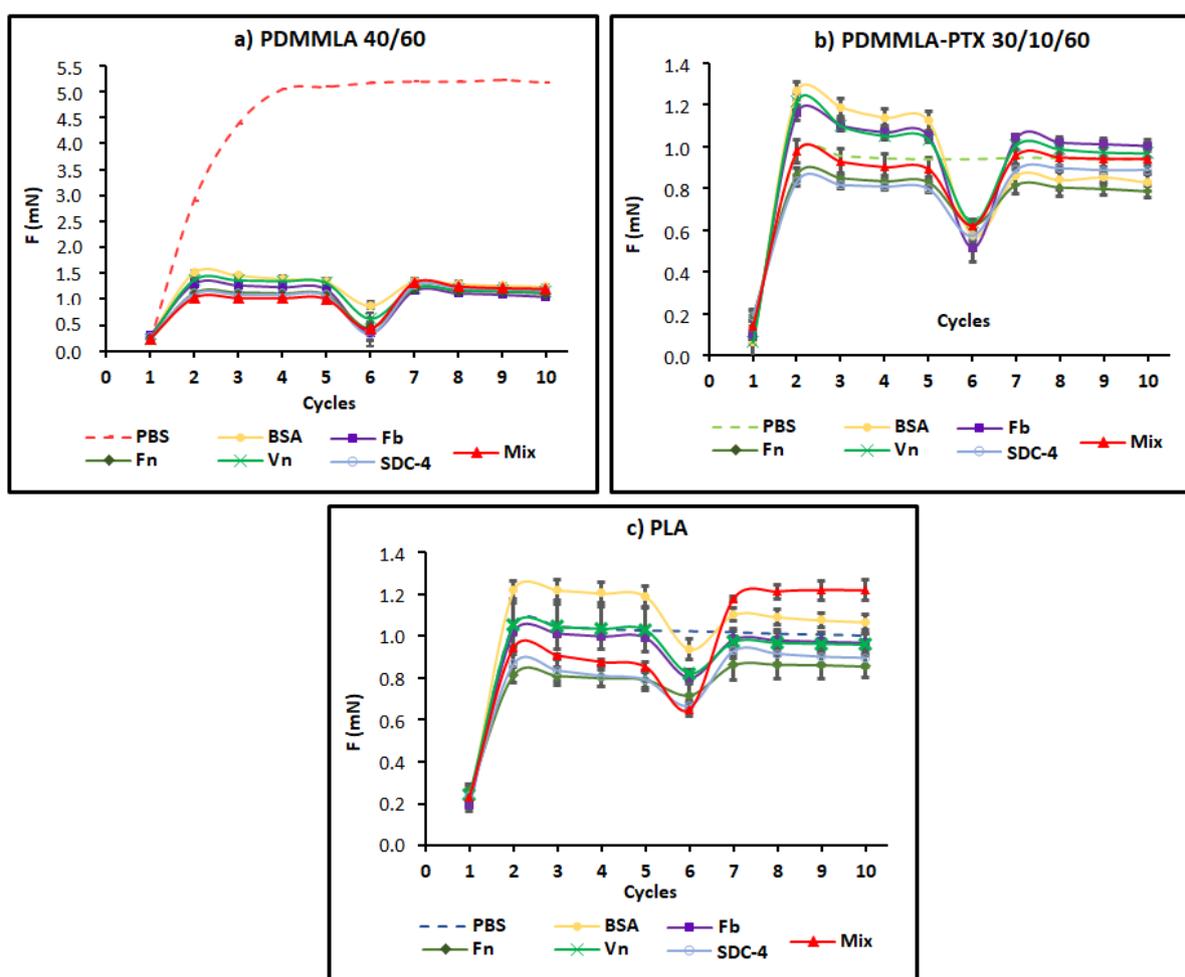


Figure 3.3 : Courbes d'adsorption et de désorption/rinçage de différentes protéines sur les trois polymères et les profils du blanc de tous les polymères étudiés
a) le PDMMLA 40/60 [P4], b) le PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et c) le PLA (n = 3)

1.2. Études de la rugosité de surface des polymères

La rugosité de surface est une autre propriété de surface déterminante pour la réponse cellulaire sur la surface d'un biomatériau. Dans cette partie, la rugosité de surface des nouveaux dérivés de PDMMLA, ainsi que celle du PLA a été évaluée grâce à une technique de mesure de profils de surface sans contact, la profilométrie. Deux techniques ont été utilisées dans la réalisation de cette étude : la *spin coating* et de *dip coating*, qui permettent d'obtenir une couche fine de polymères sur des surfaces plates.

1.2.1. Dip coating

Le *dip coating* est la méthode la plus simple et la plus rapide pour la préparation des films minces. Dans cette méthode, la plaque est immergée dans une solution de polymère qui se répand naturellement et de manière homogène sur la surface de la plaque par l'effet de la traînée visqueuse, de la force de gravité et de la montée capillaire. La plaque est ensuite retirée verticalement à vitesse constante et l'évaporation du solvant permet la solidification du revêtement final (figure 3.4).^{1,2}

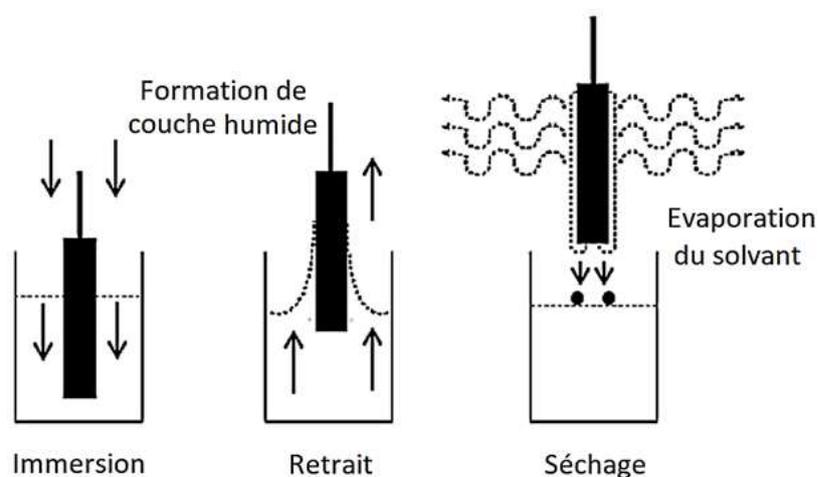


Figure 3.4 : Étapes du processus de *dip coating*
Les flèches pleines montrent le sens du mouvement de la plaque.³

1.2.2. Spin Coating

La technique de *spin coating* est utilisée pour préparer des films minces et uniformes d'une épaisseur de l'ordre du micromètre au nanomètre. La plaque est placée sur le mandrin rotatif de l'appareil, et la force centrifuge entraîne l'étalement du liquide déposé vers les extrémités de la plaque. En effet, le processus de dépôt par *spin coating* se compose de plusieurs

étapes comme montrées dans la figure 3.5. Les deux principaux facteurs dans le procédé de *spin coating* sont la force centrifuge, qui permet l'écoulement radial du liquide, et la vitesse d'évaporation du solvant. L'augmentation de ces paramètres entraîne la diminution de l'épaisseur du film déposé.⁴ Bien que la technique de *spin coating* permette de produire un revêtement fin et uniforme, son application est limitée à des petites surfaces de quelques centimètres.¹

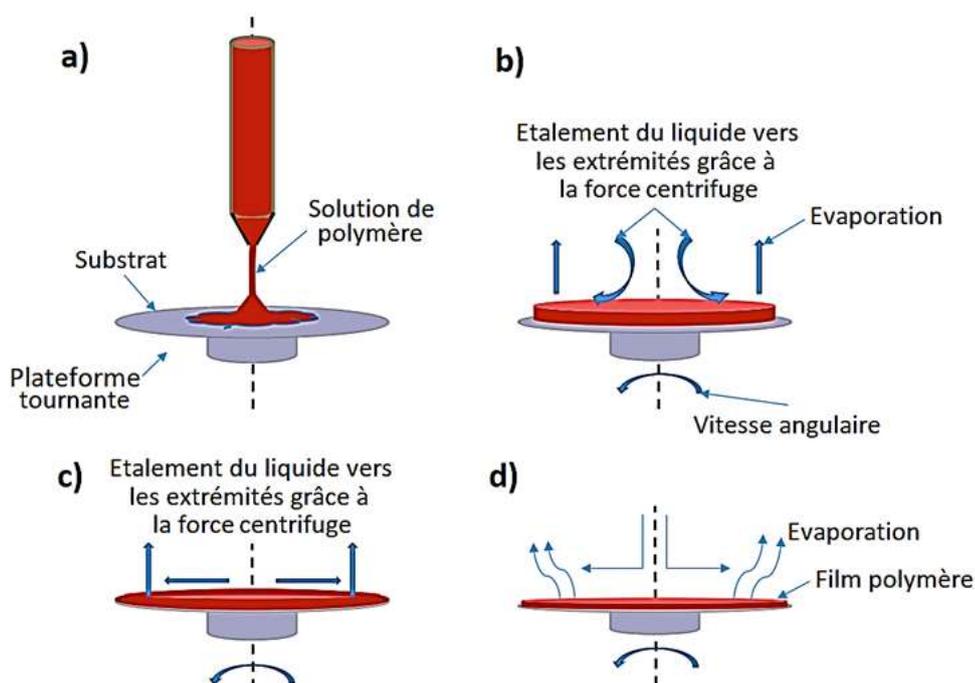


Figure 3.5 : Illustration schématique du dépôt de film polymère par *spin coating*
 a) étape de dépôt de solution de polymère, b) rotation et accélération (*spin-up*) du support,
 c) arrêt de la rotation (*spin-off*), d) évaporation du solvant⁵

1.2.3. Profilométrie

La profilométrie permet de mesurer les défauts géométriques des surfaces produits par le dépôt d'une couche mince de substrat, ou par la qualité de la surface du substrat comme la rugosité (figure 3.6).⁶ Le profilomètre sert à mesurer les variations d'épaisseurs micrométriques, voire nanométriques de couches minces ou d'objets structurés. La précision en épaisseur est de l'ordre du nanomètre et la précision latérale de quelques micromètres. Une pointe, dont l'extrémité présente un rayon de courbure de 12 μm se déplace à la surface de l'objet étudié et balaye la surface de l'échantillon.

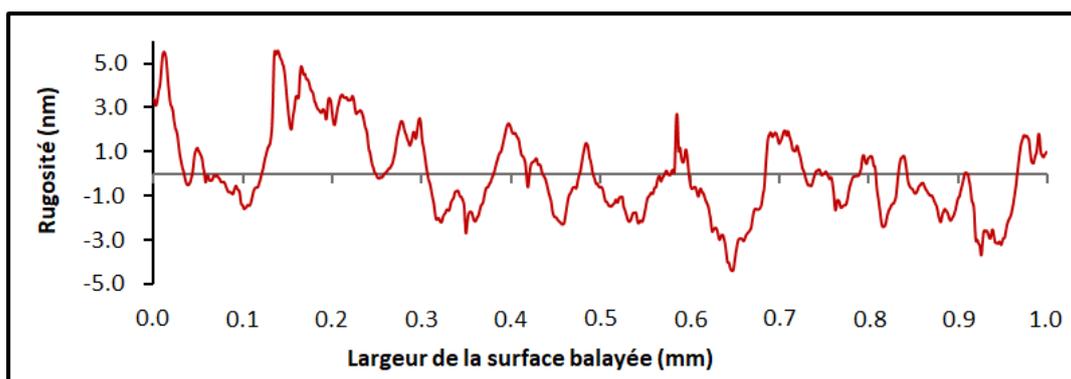


Figure 3.6: Surface d'une plaque métallique nue balayée par le profilomètre

La rugosité moyenne arithmétique (R_a) indique l'écart moyen entre les pics et les creux de la surface. La rugosité de surface est de l'ordre de quelques nanomètres sur cette plaque.

Cette technique permet également de mesurer l'épaisseur d'un film déposé sur une surface plate. Pour mesurer l'épaisseur, il est nécessaire de créer une rayure sur le film déposé en formant une brèche avec une partie haute qui est la surface du film polymère, et une partie creuse qui est donc la surface de la plaque support (figure 3.7). La différence de niveau indique donc l'épaisseur de la couche de polymère déposée sur la plaque. Ces rayures sont généralement réalisées à l'aide d'une aiguille ou la pointe d'une pince.⁷

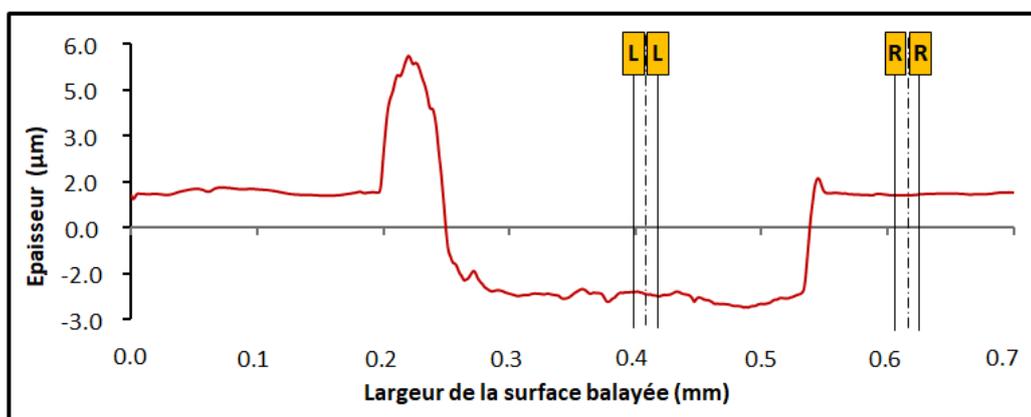


Figure 3.7 : Balayage de la surface d'une plaque métallique, recouverte d'une couche de polymère par *spin coating*

Le profilomètre détermine l'épaisseur de la couche déposée en faisant la différence entre les niveaux indiqués : (R) film polymère sur la plaque, (L) trait créé sur le film polymère permettant d'atteindre la surface de la plaque sur laquelle le film est déposé.

Les valeurs moyennes de la rugosité de surface R_a sont présentées dans la figure 3.8. R_a est la rugosité moyenne arithmétique qui correspond à la moyenne des écarts par rapport à la ligne moyenne sur une longueur d'échantillonnage. C'est le paramètre de rugosité le plus fréquemment utilisé et qui donne une description générale des variations de niveaux.⁸

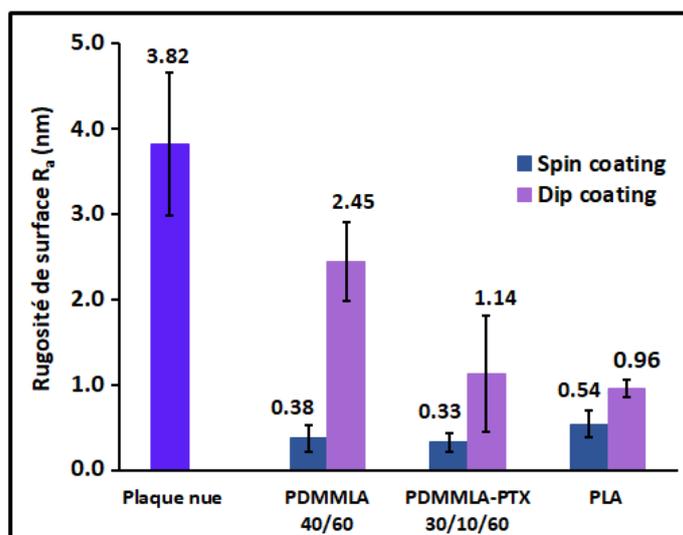


Figure 3.8 : Histogramme représentant la rugosité de surface
Rugosité moyenne « R_a » de la plaque métallique nue et de trois polymères déposés par *spin coating* et par *dip coating* ($n = 3$).

Les résultats obtenus montrent que la surface de la plaque métallique sans polymère a une rugosité plus élevée que celles couvertes de polymère, et la rugosité R_a est plus faible dans le cas des plaques recouvertes par *spin coating*. Les trois polymères montrent une rugosité inférieure à 1 nm ($R_a^{40/60} = 0.38 \pm 0.15$ nm, $R_a^{30/10/60} = 0.33 \pm 0.11$ nm, $R_a^{PLA} = 0.54 \pm 0.16$ nm), tandis que ces valeurs augmentent pour le *dip coating* ($R_a^{40/60} = 2.45 \pm 0.47$ nm, $R_a^{30/10/60} = 1.14 \pm 0.68$ nm et $R_a^{PLA} = 0.96 \pm 0.10$ nm). Le *spin coating* permet donc d'obtenir un revêtement plus lisse comparé au *dip coating*.

Une surface est considérée comme lisse pour une valeur de R_a inférieure à $1 \mu\text{m}$.⁹ Les trois surfaces étudiées dans cette expérience présentent une R_a de l'ordre de quelques nanomètres quelle que soit la technique de revêtement. Les trois polymères peuvent alors être classés comme étant lisses.

1.3. Imagerie par microscopie optique et épaisseur du film polymère

Étant donné que l'objectif principal du développement du PDMMLA-PTX 30/10/60 est de l'utiliser pour recouvrir les stents, le revêtement de stents métalliques a été effectué dans cette partie par la technique de *dip coating*. De même que pour les plaques métalliques, le stent est immergé dans une solution de polymère afin de recouvrir la surface de façon homogène. Après l'évaporation complète du solvant et solidification du film polymère, des images de la surface du stent métallique ont été enregistrées grâce à la technique de microscopie optique à réflexion. Ces images seront comparées à celles du stent avant revêtement.

Le microscope optique permet de visualiser les objets de petites dimensions en grossissant l'image. En mode réflexion, la lumière passe par l'objectif une première fois et après avoir été réfléchi par la surface de l'échantillon, elle repasse par l'objectif pour l'observation de l'objet. La microscopie en mode réflexion permet d'observer les objets opaques ou épais, comparé au mode transmission où la lumière traverse l'échantillon transparent.^{10,11}

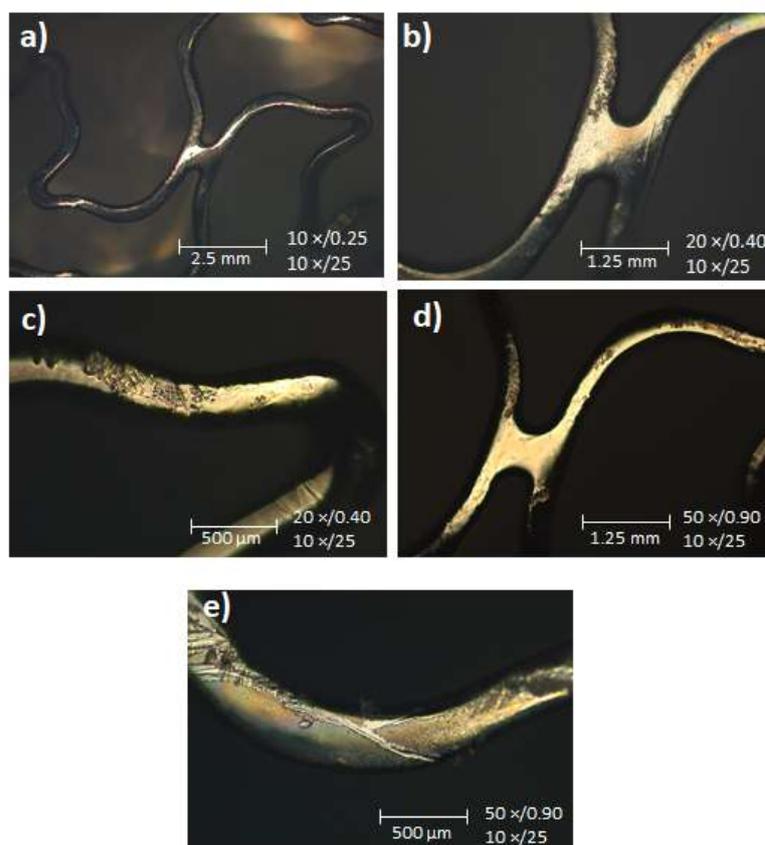


Figure 3.9 : Images d'un stent métallique avant et après revêtement par le PDMMLA-PTX 30/10/60, enregistrées par le microscope optique

a) Stent nu (G^* 10 \times), b) Stent nu (G 25 \times), c) Stent nu (G 50 \times), d) Stent recouvert de PDMMLA-PTX 30/10/60 (G 25 \times), e) Stent recouvert de PDMMLA-PTX 30/10/60 avec des rayures créées à la surface du film (G 50 \times). (G^* = grossissement)

La figure 3.9 présente les images d'un stent réalisées par la microscopie optique à différents grossissements. Les images (a), (b) et (c) montrent la surface nue du stent et l'image (d) montre la surface du même stent recouvert du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 par *dip coating*. Ces images révèlent que la surface du stent est plus lisse grâce à la présence du polymère qui s'étale sur la surface et s'incruste dans les imperfections du métal. L'image (e) correspond également au stent recouvert du terpolymère avec une rayure créée à la surface du film afin de mieux visualiser la couche du polymère formée sur le stent.

La profondeur des rayures formées dépend de la concentration de la solution dans laquelle le *dip coating* est réalisé. Basé sur les optimisations réalisées lors des études précédentes sur les dérivés de PDMMLA, le *dip coating* a été effectué en immergeant le stent et les plaques dans une solution de polymère de 40 mg/mL.¹²

L'étude de la surface par profilométrie permet de déterminer la profondeur des rayures, autrement dit, l'épaisseur de la couche polymère sur la surface. L'analyse de surface par le profilomètre étant praticable uniquement sur des surfaces plates, la structure cylindrique d'un stent n'est pas adaptée pour cette étude. Par conséquent, ces mesures sont effectuées sur des plaques métalliques Co-Cr recouvertes de polymère de la même manière que le stent, afin de représenter les mêmes effets du *dip coating* sur le stent. Dans ce cas, la rayure est réalisée sur le film polymère déposé sur la plaque et la mesure de la profondeur de cette rayure donne l'information sur l'épaisseur de la couche polymère « H ».

Une mesure d'épaisseur complémentaire est également réalisée sur les plaques recouvertes par *spin coating* pour comparaison. La figure 3.10 présente les résultats de l'étude de l'épaisseur du film polymère sur la surface des plaques métalliques recouvertes par *dip coating* et par *spin coating*.

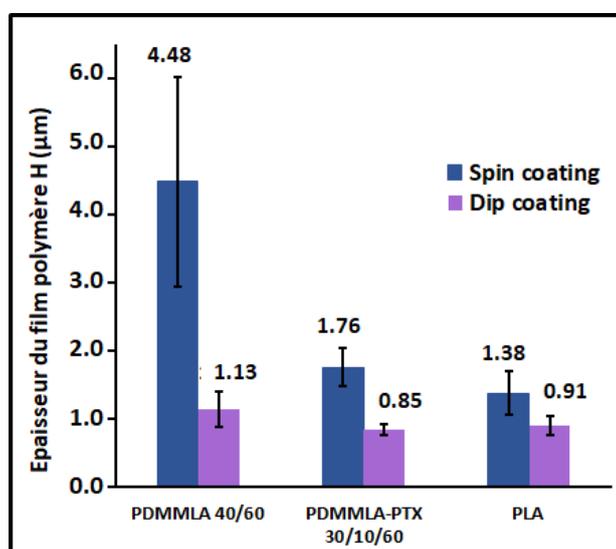


Figure 3.10: Histogramme représentant l'épaisseur de film polymère
Épaisseur « H » du film polymère déposé sur la surface des plaques métalliques par *spin coating* et par *dip coating* (n = 3).

Les résultats expérimentaux indiquent que l'épaisseur du film polymère formée par *dip coating* est autour de 1 μm pour les trois polymères étudiés : $H_{40/60}^{DC} = 1.13 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $H_{30/10/60}^{DC} = 0.85 \pm 0.08 \mu\text{m}$ et $H_{PLA}^{DC} = 0.91 \pm 0.14 \mu\text{m}$ (DC = *dip coating*).

En revanche, les valeurs de H sont différentes pour le *spin coating* ($H_{40/60}^{SC} = 4.48 \pm 1.53 \mu\text{m}$, $H_{30/10/60}^{SC} = 1.76 \pm 0.28 \mu\text{m}$ et $H_{PLA}^{SC} = 1.38 \pm 0.31 \mu\text{m}$) (SC = *spin coating*). Cette différence de H est due à la concentration de la solution de polymère utilisée pour effectuer le revêtement. En effet, le *dip coating* est réalisé dans une solution de 40 mg/mL pour obtenir un revêtement homogène sur la structure ciselée du stent. Les plaques sont donc également recouvertes en utilisant la même solution. En revanche, le *spin coating* est effectué avec une solution de polymère plus concentrée de 400 mg/mL qui est la concentration utilisée dans la préparation des films polymères pour les études d'adhésion protéique et du comportement cellulaire. D'autre part, la vitesse de rotation élevée dans la technique de *spin coating* requiert une solution plus visqueuse afin d'éviter la perte de produit lors des expériences. En conclusion, il est logique d'obtenir une épaisseur plus importante avec le *spin coating* comparée au *dip coating*.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus pour l'adhésion protéique et la rugosité, les propriétés de surface des nouveaux dérivés de PDMMLA, en particulier du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 sont proches et comparables à celles du PLA. Les premières analyses étant encourageantes, elles nécessitent d'être complétées par davantage d'études comme la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie électronique à balayage (MEB) afin de mieux caractériser la surface et d'arriver à une conclusion définitive sur tous les aspects de propriétés de surface de ce nouveau polymère.

2. Étude de la libération du Paclitaxel

Au cours du chapitre 2, le greffage covalent du Paclitaxel sur les dérivés de PDMMLA a été décrit. Cette réaction a une importance primordiale, en particulier dans le cas du copolymère 40/60 [P4] car le polymère greffé est destiné à être utilisé pour des applications biomédicales. Dans cette partie, une étude *in vitro* de la cinétique et du profil de libération du Paclitaxel du PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] est détaillée.

Cette étude est effectuée en trois séries et en triplicate ; le terpolymère est mis en suspension dans une solution de : 1) PBS sans enzyme, 2) en présence de l'enzyme estérase et 3) en présence de l'enzyme lipase à 37°C pendant une durée de 15 semaines.

L'estérase est une enzyme du groupe des hydrolases qui catalyse la coupure des liaisons ester *via* une réaction d'hydrolyse. Les estérases humaines sont importantes pour l'hydrolyse catalytique des esters des xénobiotiques, tels que les médicaments et les pesticides, et elles jouent un rôle important dans la détoxification des médicaments en produits non toxiques ou composés actifs.¹³ Cette caractéristique des estérases a été utilisée dans le développement pharmaceutique sous forme de prodrogues estérifiées.¹⁴

Les lipases sont des enzymes spécifiques qui transforment les glycérides en glycérol et en acides gras. Par ce biais, elles sont une sous-classe des estérases qui hydrolysent également les liaisons ester.^{15,16}

La nouvelle liaison créée entre le Paclitaxel et le PDMMLA 40/60 étant une liaison ester, l'effet de ces enzymes sur la cinétique de libération du Paclitaxel est examiné dans cette étude.

• Droite d'étalonnage du Paclitaxel

Le Paclitaxel est une molécule qui absorbe en UV à 227 nm et permet une détection par spectroscopie UV-visible. Dans le cadre de cette étude, le Paclitaxel est élué au travers d'une colonne chromatographique HPLC en phase inverse (C18), couplée à un détecteur UV-visible, permettant la détection du Paclitaxel et son temps d'éluion. La figure 3.11 présente les chromatogrammes du Paclitaxel à différentes concentrations allant de 3 µg/mL à 100 µg/mL.

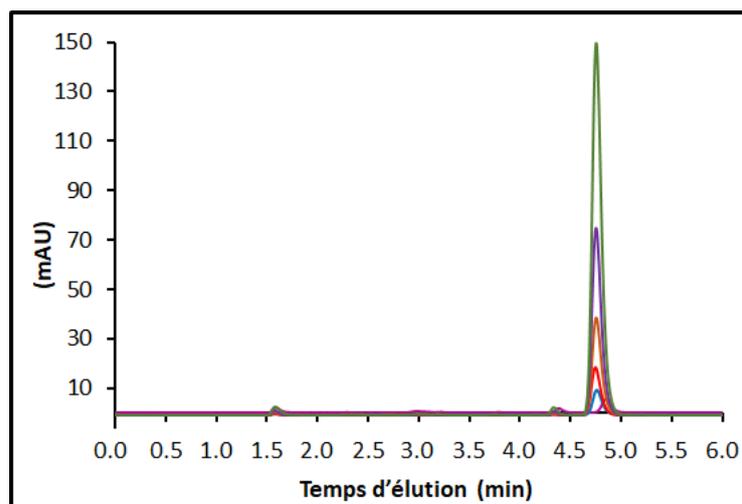


Figure 3.11 : Chromatogrammes HPLC C18 du Paclitaxel enregistrés à 227 nm
Le pic du Paclitaxel élué par la phase mobile ACN/H₂O (7 : 3) est détecté à 4.74 minutes.

La hauteur du pic détecté étant proportionnelle à la concentration de chaque échantillon, ces chromatogrammes fournissent un ensemble de points permettant de tracer la droite d'étalonnage du Paclitaxel. Il s'agit de la droite de la hauteur de pic (H) en fonction de la concentration, qui grâce à l'équation de la droite, permet de calculer la concentration du Paclitaxel libéré lors de l'étude de la libération (figure 3.12).

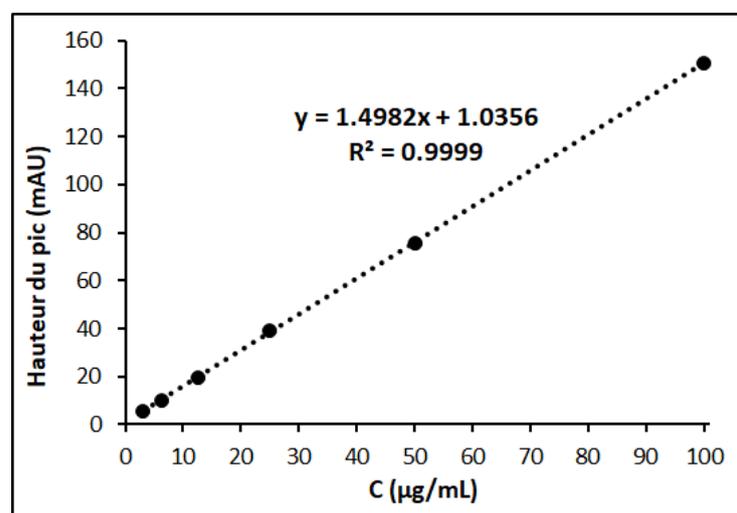


Figure 3.12 : Droite d'étalonnage du Paclitaxel, tracée à partir de la hauteur des pics à différentes concentrations

La concentration des échantillons varie entre 3 µg/mL et 100 µg/mL.

• Libération du Paclitaxel

L'expérience *in vitro* de la cinétique de libération permet de déterminer le profil de libération du Paclitaxel en fonction du temps. La figure 3.13 montre les graphiques représentant la libération cumulée du Paclitaxel en fonction du temps. La concentration correspondante du Paclitaxel pour chaque mesure est déterminée à partir de l'équation obtenue grâce à la droite d'étalonnage :

$$y = 1.4982 x + 1.0356 \quad \text{Équation 3.1}$$

où l'abscisse x correspond à la concentration du Paclitaxel, et l'ordonnée y à la hauteur du pic détecté en HPLC.

On constate que la libération du Paclitaxel dans le cas des trois expériences sans enzyme, avec l'estérase et avec la lipase suit une droite croissante, ce qui indique que la quantité cumulée du Paclitaxel libéré augmente au cours du temps. Cette augmentation linéaire indique que cette expérience suit une cinétique d'ordre zéro.

Une cinétique de libération d'ordre zéro consiste en une libération constante du principe actif avec le temps selon l'équation suivante :

$$C_t = C_0 + k_0.t \quad \text{Équation 3.2}$$

où C_t est la quantité de principe actif libéré au temps t , C_0 la quantité de principe actif au temps 0 (souvent égale à 0), et k_0 , la constante de vitesse de libération d'ordre zéro.

Ce profil de libération est le cas idéal, car il permet de maintenir une dose constante de médicament dans le sang pour une période prolongée et de minimiser les fluctuations des concentrations plasmatiques du médicament.¹⁷⁻²⁰ La courbe de libération en fonction du temps donne alors une droite, où la pente correspond à la constante de vitesse de libération d'ordre zéro k_0 , et le coefficient de corrélation du graphique permet de savoir si la libération du médicament suit une cinétique d'ordre zéro ou non.

Comme indiqué sur la figure 3.13, les courbes de libération du Paclitaxel sont quasiment des droites avec des coefficients de corrélation proches de 1. On peut donc considérer que la libération *in vitro* du Paclitaxel suit une cinétique d'ordre zéro dans les trois cas.

Les trois conditions donnent donc trois droites avec les équations suivantes :

- Sans enzyme (PBS) : $C_t = 2.7967 t + 84.685$
- Avec de l'estérase : $C'_t = 3.0067 t + 106.88$
- Avec de la lipase : $C''_t = 1.8035 t + 86.425$

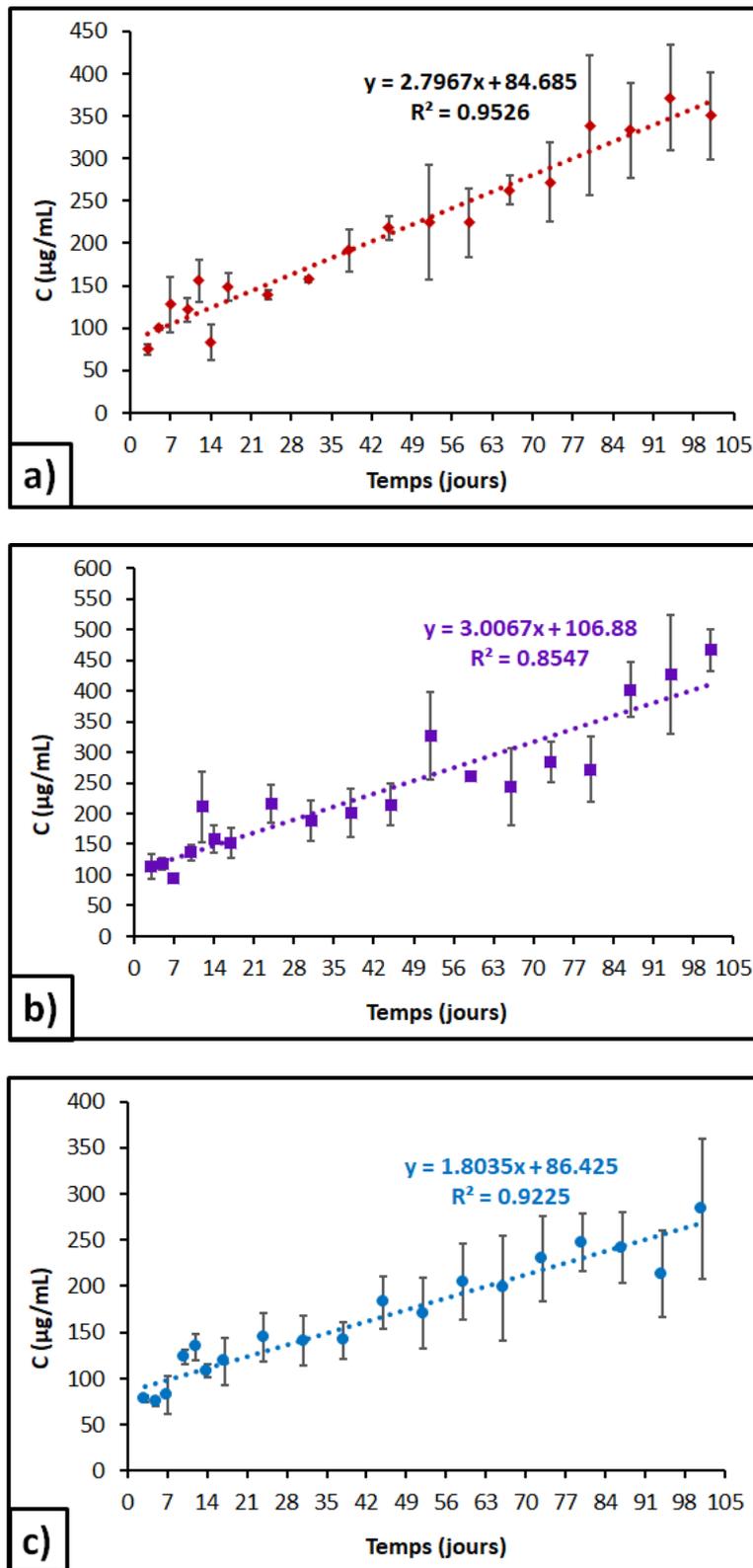


Figure 3.13 : Profils de libération *in vitro* du Paclitaxel du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60

a) sans enzyme ; b) en présence de l'enzyme estérase ; c) en présence de l'enzyme lipase
(n = 3)

La figure 3.14 montre la superposition des graphiques de libération du Paclitaxel dans les trois situations étudiées. La comparaison des trois droites permet de voir les différences de comportement par rapport aux conditions d'incubation. D'après ces résultats, la cinétique de libération ne semble pas être affectée considérablement par la présence de l'estérase et de la lipase. En effet, la présence de l'estérase accélère légèrement la libération, car la pente de la droite k_0 dans ce cas est de $3.0067 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{J}^{-1}$, comparée à celle du cas sans enzyme k_0 qui est égale à $2.7967 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{J}^{-1}$. En revanche, cette pente diminue dans le cas de la lipase ($k_0 = 1.8035 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{J}^{-1}$) en abaissant légèrement la vitesse de la libération.

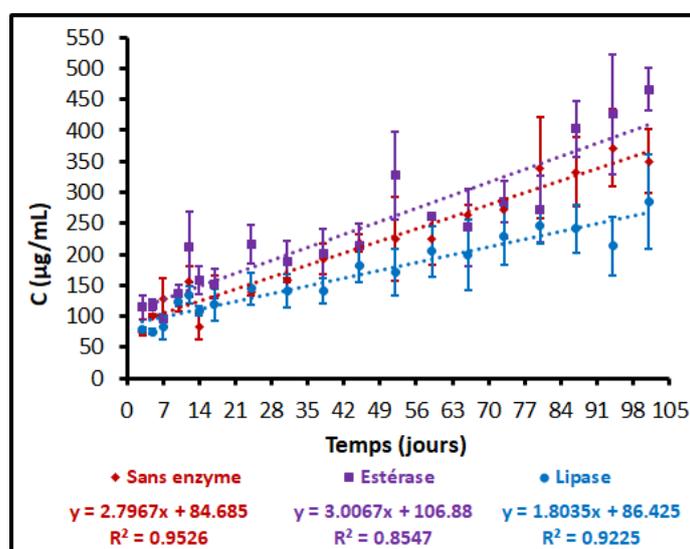


Figure 3.14 : Comparaison des profils de libération du Paclitaxel des trois séries
Rouge : PBS (sans enzyme), violet : en présence d'estérase et bleu : en présence de lipase ;
(n = 3 pour chaque série)

Les données obtenues dans cette partie concernant la libération du Paclitaxel permettent de conclure qu'après le greffage covalent du Paclitaxel sur le PDMMLA 40/60, la libération de ce dernier suit une cinétique d'ordre zéro. C'est le profil de libération idéal pour maintenir une dose constante de médicament dans le sang sur une période prolongée. Les résultats montrent également que le Paclitaxel n'est pas complètement libéré sur la durée de quinze semaines d'expérience car la courbe représentant la libération n'a pas atteint un plateau. Il est donc nécessaire de prolonger la durée de l'expérience dans le cas des trois séries afin de pouvoir libérer la totalité du Paclitaxel. Une autre possibilité serait de diminuer le pourcentage du Paclitaxel à l'étape du greffage afin de le libérer intégralement en une plus courte durée.

3. Étude biologique, comportement des cellules endothéliales

Cette partie présente une étude *in vitro* de la réponse des cellules HUVECs vis-à-vis des trois polymères analysés. Une première évaluation de cytotoxicité des polymères est effectuée par le test de viabilité LDH. L'expérience de l'étalement cellulaire est ensuite mise en œuvre afin de déterminer l'adhérence des cellules HUVECs aux surfaces étudiées.

3.1. Test de cytotoxicité LDH

Les lactates déshydrogénases (LDH) sont des enzymes présentes dans une grande diversité d'organismes (végétaux et animaux). Elles catalysent la conversion du pyruvate en lactate et vice-versa.

Une méthode courante pour déterminer la cytotoxicité est basée sur la mesure de l'activité des enzymes cytoplasmiques de la LDH, libérées dans le milieu de culture cellulaire en cas d'altération de l'intégrité membranaire, induite par un processus de mort cellulaire.

La LDH est une enzyme cytoplasmique stable que l'on trouve dans toutes les cellules. La LDH est rapidement libérée dans le surnageant de la culture cellulaire lorsque la membrane plasmique est endommagée, une caractéristique clé des cellules en état de l'apoptose ou de la nécrose. L'activité LDH peut être facilement quantifiée en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), produit pendant l'oxydation du lactate en pyruvate. Ce protocole mesure la réduction du chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) par le NADH en formazan (figure 3.15).

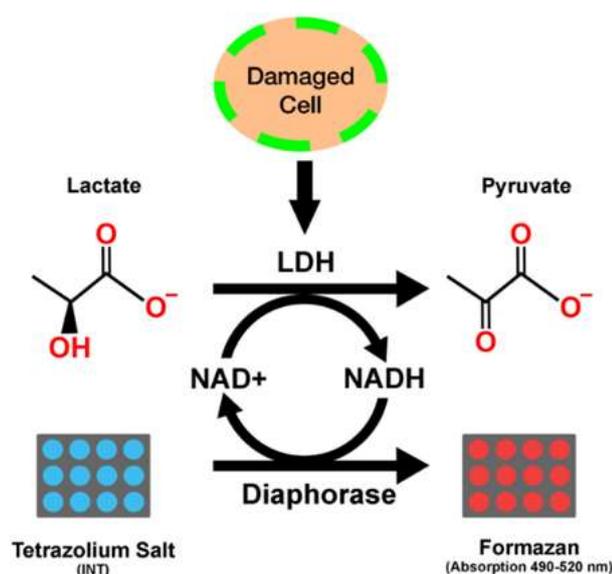


Figure 3.15: Principe du test LDH.

Réaction d'oxydation du lactate en pyruvate par la LDH libérée par les cellules mortes.

Le formazan est soluble dans l'eau et peut être facilement détecté par colorimétrie par la mesure de l'absorbance à 490 nm. La quantité de formazan formée est directement proportionnelle à la quantité de LDH dans le milieu le milieu conditionné des cellules, qui est, à son tour, directement proportionnelle au nombre de cellules endommagées ou mortes.

L'analyse de la LDH est alors un test important pour vérifier la viabilité cellulaire qui permet d'obtenir des résultats rapidement, qui sont fiables et reproductibles sur la toxicité potentielle des composés.^{21,22}

La figure 3.16 présente l'histogramme de la cytotoxicité des polymères PDMMLA 40/60 [P4], PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10], du PLA, et du contrôle (fibronectine).

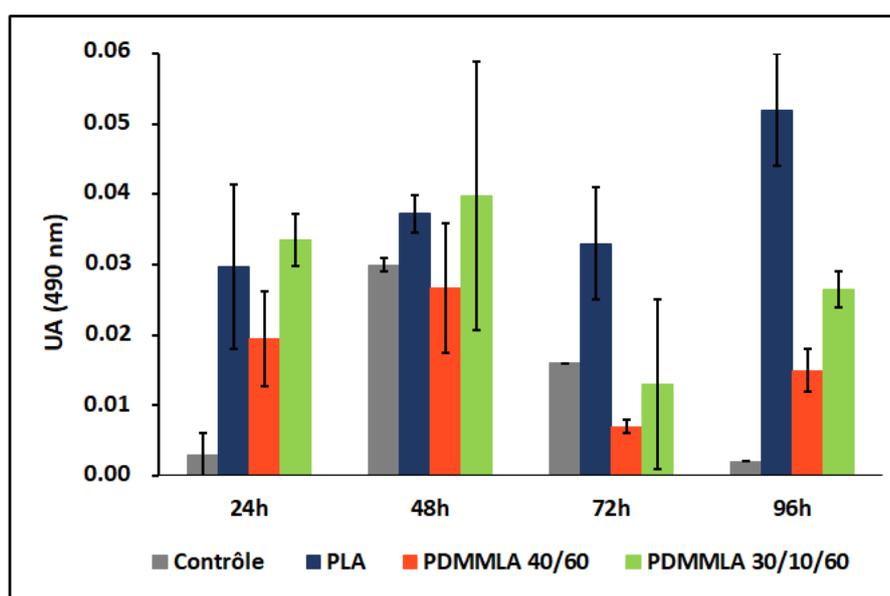


Figure 3.16 : Comparaison de la cytotoxicité des trois polymères étudiés, et le contrôle vis-à-vis des HUVECs

*UA = unité arbitraire ; (n= 2).

Les résultats obtenus montrent que les trois polymères étudiés présentent une légère cytotoxicité comparable sur une durée de quatre jours par rapport au contrôle (cellules HUVECs cultivées sur la fibronectine, barre grise). En effet, nous pouvons observer que le greffage covalent du Paclitaxel sur le copolymère 40/60 [P4] a entraîné une légère augmentation de la toxicité au sein du polymère (figure 3.16, barre rouge *versus* barre verte). Ce phénomène est confirmé pour tous les dosages LDH sur quatre jours. Toutefois, le niveau de toxicité du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] reste comparable à celui du PLA avec un léger écart pour les prélèvements à 24h et 48h. Cependant, on observe une diminution de la toxicité de 4.7 fois pour le copolymère 40/60 (0.007 ± 0.001 UA, barre rouge) et une diminution de 2.5 fois pour le terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 (0.013 ± 0.012 UA, barre verte), en

comparaison avec le PLA (0.033 ± 0.008 UA, barre noire) à 72h. De plus, on remarque une diminution de la toxicité de 3.4 fois pour le copolymère 40/60 (0.015 ± 0.003 UA) et une diminution de 1.9 fois pour le terpolymère (0.026 ± 0.003 UA), en comparaison avec le PLA (0.052 ± 0.008 UA) à 96h.

Les premiers résultats du test LDH s'avèrent donc très encourageants du point de vue de la viabilité cellulaire du nouveau terpolymère vis-à-vis des cellules endothéliales.

3.2. Étalement des HUVECs (*spreading*)

Le test d'étalement cellulaire est réalisé dans le but d'évaluer la morphologie cellulaire sur les différentes surfaces. L'analyse des changements de forme des cellules est réalisée à l'aide du marquage fluorescent du noyau et du cytosquelette actine grâce à deux fluorochromes : le DAPI et la Phalloïdine.

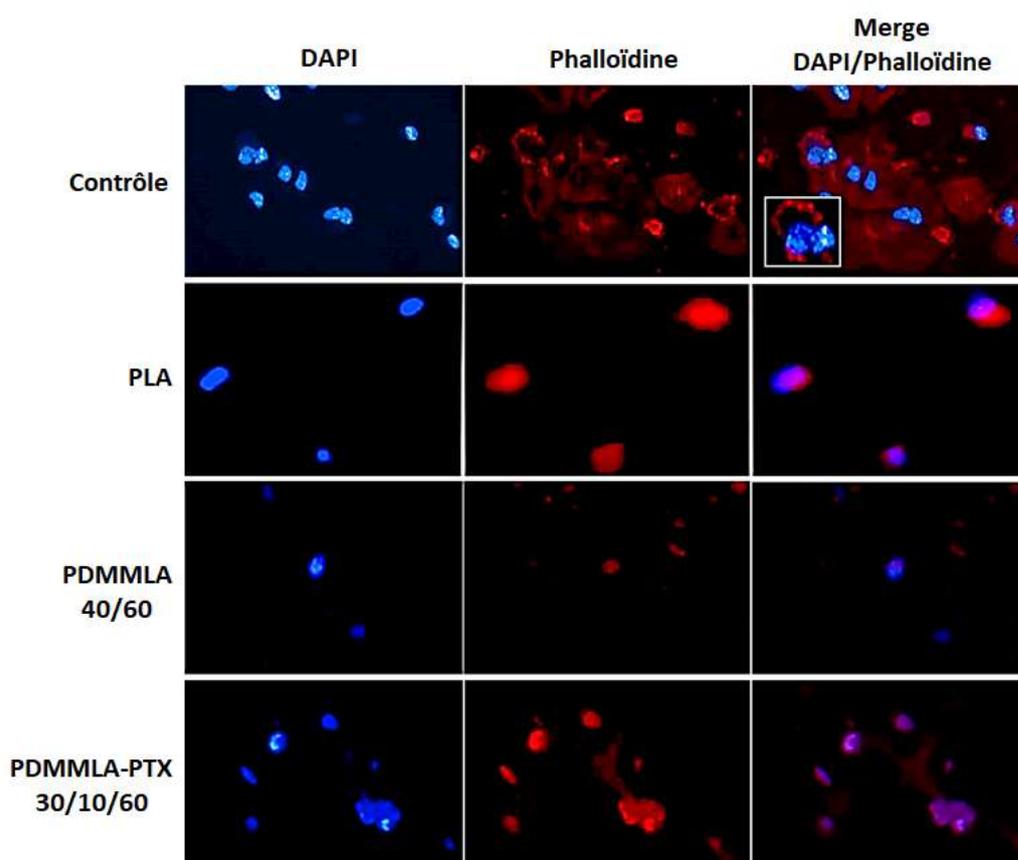


Figure 3.17 : Étalement des cellules HUVECS sur les surfaces des polymères et sur une surface de contrôle (fibronectine) après 2h d'incubation
Le cytosquelette actine est marqué par la Phalloïdine (rouge), et le noyau des cellules le DAPI (bleu) (n = 2). (grossissement $\times 200$ et $\times 400$)

La figure 3.17 montre les images des HUVECs après 2h d'incubation sur les surfaces des trois polymères étudiés, ainsi que sur la surface du contrôle (fibronectine), observées à l'aide du microscope à fluorescence.

On peut constater que l'étalement des HUVECs sur la surface du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 est plus prononcé en comparaison avec la surface du PDMMLA 40/60. On peut également voir le changement de morphologie de ces cellules sur le terpolymère, indiquant une bonne affinité des HUVECs vis-à-vis de la surface du terpolymère.

4. Conclusion

L'ensemble des différentes études menées dans ce chapitre permet de caractériser les polymères à différents points de vue. Les nouveaux dérivés de PDMMLA analysés dans cette partie sont le PDMMLA 40/60 [P4] sur lequel nous avons greffé chimiquement le Paclitaxel pour obtenir le PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]. Le PLA est analysé en parallèle, afin de comparer les différents aspects de ces nouveaux polymères à ceux d'un biopolymère approuvé.

Les résultats de l'étude de surface dans la première partie permettent de voir que le terpolymère montre des propriétés comparables à celles du PLA en termes d'adhésion protéique et de rugosité.

Les données récupérées par la mesure de la force de surface par la technique de DCA lors de l'immersion des films polymères dans des solutions protéiques et dans le PBS, indiquent que l'adsorption et la réorientation des différentes protéines sont similaires sur les surfaces du terpolymère et du PLA.

Concernant la rugosité de surface, les résultats obtenus avec deux techniques de revêtement et différentes concentrations de solution polymère, indiquent que les trois surfaces étudiées sont lisses et homogènes. Les images du stent métallique recouvert du PDMMLA-PTX 30/10/60 permettent d'observer la surface de ce dernier avant et après revêtement, qui mettent en évidence l'adhésion d'un film polymère sur la surface du stent.

Un autre aspect élaboré dans ce chapitre est la libération du Paclitaxel greffé de manière covalente au PDMMLA 40/60. En effet, l'objectif principal de la réaction de greffage abordée dans le chapitre 2, est d'améliorer la cinétique de libération du principe actif accompagnant le polymère biodégradable, et de limiter le phénomène de resténose en fournissant les meilleures conditions pour la ré-endothélialisation et donc la régénération de l'artère. L'étude de la libération révèle alors des informations importantes sur le profil de libération, ainsi que la quantité de Paclitaxel libérée par jour. Les résultats de cette étude sont très encourageants ; la libération du Paclitaxel suit une cinétique d'ordre zéro qui est une forme de libération idéale dans le traitement des maladies sur une longue période. Selon ces résultats, l'utilisation des enzymes estérase et lipase n'ont pas un effet considérable sur la vitesse de libération malgré un léger changement de la constante de vitesse.

Une étude de la cinétique de dégradation du polymère est également en cours de réalisation et pourra être complétée très prochainement.

Les études du comportement des cellules HUVECs vis-à-vis des trois polymères, montrent des résultats positifs et encourageants pour le nouveau PDMMLA-PTX 30/10/60 en termes de viabilité et d'étalement cellulaire. En effet, le test LDH des trois polymères révèle que la toxicité du PDMMLA 40/60 augmente avec le greffage du Paclitaxel. Cependant, le niveau de toxicité du terpolymère reste comparable à celui du PLA à 24h et à 48h et montre même une toxicité plus faible que le PLA à 72h et 96h. D'autre part, le test de *spreading* montre que parmi les trois surfaces analysées, l'étalement des HUVECs est plus prononcé sur la surface du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 et du PLA, que sur la surface du copolymère 40/60.

Ces résultats doivent être complétés par d'autres études, telles que l'étude de l'adhésion des HUVECs à la surface des polymères *in vitro*, ainsi que des tests similaires avec d'autres cellules, telles que les monocytes ou encore les plaquettes.

Références

- [1] A. Mishra, N. Bhatt, A. K. Bajpai, “Nanostructured superhydrophobic coatings for solar panel applications” *Nanomaterials-Based Coatings: Fundamentals and Applications*, 397–424, **2019**.
- [2] J. Puetz, M. A. Aegerter, “Dip Coating Technique” *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*. 37–48, **2004**.
- [3] J. H. M. Harun, W. S.W. Asri, R. I.M. Alias, J. Zulkifli, F. H. Kadirgama, K. Ghani, S. A.C. Shariffuddin, “A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials” *Ceramics International*. 44 (2), 1250-1268, **2018**.
- [4] T. Kim, J. H. Kim, J. W. Park, “All-Solution-Processed Organic–Inorganic Hybrid Perovskite Light-Emitting Diodes under Ambient Air” *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* 216 (22), 1–13, **2019**.
- [5] A. Das, R. Chanda, “Fabrication and Properties of Spin-Coated Polymer Films” *Nano-Size Polym. Prep. Prop. Appl.* chapter 10, 283-306, **2016**.
- [6] E. Incesu, N. Yanikoglu, “Evaluation of the effect of different polishing systems on the surface roughness of dental ceramics” *J. Prosthet. Dent.* 124 (1), 100–109, **2020**.
- [7] J. W. Wood, R. D. Redin, “A simple profilometer for film thickness measurement” *Rev. Sci. Instrum.* 64 (8), 2405–2406, **1993**.
- [8] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. A. Maksoud, I. M. Elewa, H. H. Soliman, “Roughness parameters” *J. Mater. Process. Technol.* 123 (1), 133–145, **2002**.
- [9] S. Yamashita, Daisuke. Machigashira, Miho. Miyamoto, Motoharu. Takeuchi, Hironobu. Noguchi, Kazuyuki. Izumi, Yuichi. Ban, “Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia” *Dent. Mater. J.* 28 (4), 461–470, **2009**.
- [10] H. Coceancigh, D. A. Higgins, T. Ito, “Optical Microscopic Techniques for Synthetic Polymer Characterization” *Analytical Chemistry*. 91 (1), 405-424, **2019**.
- [11] V. Ntziachristos, “Going deeper than microscopy: The optical imaging frontier in biology” *Nature Methods*. 7, 603-614, **2010**.
- [12] R. Belibel, S. Sali, N. Marival, A. Garcia-Sanchez, C. Barbaud, H. Hlawaty, “PDMMLA derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Physicochemical and biological evaluation” *Mater. Sci. Eng. C*. 117, 111284, **2020**.
- [13] H. H. Meyer, Markus R. Schütz, Aline. Maurer, “Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse” *Toxicol. Lett.* 232 (1), 159–166, **2015**.
- [14] F. G. Bahar, K. Ohura, T. Ogihara, T. Imai, “Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma” *J. Pharm. Sci.* 101 (10), 3979–3988, **2012**.
- [15] J. R. Mead, S. A. Irvine, D. P. Ramji, “Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease” *Journal of Molecular Medicine*. 80, 753-769, **2002**.
- [16] F. K. Winkler, A. D’Arcy, and W. Hunziker, “Structure of human pancreatic lipase” *Nature*. 343, 771–774, **1990**.

- [17] J. E. Möckel, B. C. Lippold, “Zero-Order Drug Release from Hydrocolloid Matrices” *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 10 (7), 1066–1070, **1993**.
- [18] H. Baishya, “Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets” *J. Dev. Drugs.* 6 (2), 1–8, **2017**.
- [19] M. P. Paarakh, P. A. N. I. Jose, C. M. Setty, G. V Peter, “Release Kinetics – Concepts and Applications” *Int. J. Pharm. Res. Technol.* 8 (1), 12–20, **2019**.
- [20] M. Kalam, M. Humayun, N. Parvez, S. Yadav, “Release Kinetics of Modified Pharmaceutical Dosage Forms: a Review” *Cont. J. Pharm. Sci.* 1, 30–35, **2007**.
- [21] S. Kaja, A. J. Payne, Y. Naumchuk, P. Koulen, “Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes” *Curr. Protoc. Toxicol.* supplement. 2.26.1- 2.26.10, **2017**.
- [22] P. Kumar, A. Nagarajan, P. D. Uchil, “Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay” *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018 (6), 465–468, **2018**.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était de développer un polymère bioactif comme revêtement de stents métalliques à partir des dérivés de PDMMLA, afin de limiter le phénomène de resténose intra-stent. La synthèse à façon des dérivés de PDMMLA à partir de différentes β -lactones α,α,β -tri-substituées permet d'obtenir des copolymères amphiphiles avec des proportions d'hydrophilie modulables. L'ajustement du niveau d'hydrophilie apporte des changements au niveau des diverses propriétés au sein du polymère, comme les propriétés physicochimiques, thermomécaniques, viscoélastique, cinétique de dégradation, ou encore le comportement cellulaire.

Au cours de cette thèse, différents aspects des dérivés de PDMMLA ont été étudiés. Dans la continuité des recherches précédentes, l'étude des propriétés de surface des trois dérivés de PDMMLA (10/90, 20/80 et 30/70) est réalisée par la technique de DCA, *via* l'analyse de l'adhésion de différentes protéines (la BSA, le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine), ainsi qu'un protéoglycane transmembranaire, le syndécan-4, sur ces surfaces. Cette technique a permis de mesurer la force à l'immersion du film polymère dans une solution protéique pour l'adsorption et dans le PBS pour la désorption. La variation de la force F montre l'adsorption et la réorientation des protéines adsorbées sur la surface puisque les valeurs de F indiquent le niveau d'hydrophilie/hydrophobie de la surface. L'ensemble des résultats montre que le copolymère 30/70 possède la surface sur laquelle toutes les protéines adhèrent avec des faibles valeurs de F ; c'est-à-dire qu'elles exposent leurs groupements hydrophobes à la surface une fois adsorbées. Les groupements acide carboxylique, plus abondants sur le copolymère 30/70, existent sous deux formes $-\text{COOH}$ et $-\text{COO}^-$ à pH neutre et favorisent les interactions hydrophiles, ioniques et de type liaisons hydrogène. Tous les résultats sur ces trois dérivés, associés avec les résultats des études précédentes, nous orientent vers le choix du pourcentage d'hydrophilie de 30% comme étant le meilleur ratio à conserver, notamment lors du greffage d'un principe actif dans la suite de nos études.

La prochaine étape du projet consistait à étudier le greffage chimique de molécules sur le PDMMLA, compte tenu de la présence des groupements acide carboxylique accessibles. Dans le but de conserver les 30% d'hydrophilie validés par les études antérieures, la synthèse d'un nouveau copolymère dérivé de PDMMLA avec 40% d'hydrophilie a été réalisée. Ainsi, en greffant 10% d'un principe actif, le pourcentage total de $-\text{COOH}$ revient à 30%. Cette étude a été appliquée dans un premier temps avec le greffage du cholestérol comme molécule modèle, puis en greffant le Paclitaxel, dans le but de développer un nouveau biopolymère accompagné de son principe actif, destiné aux applications biomédicales. Le greffage est donc réalisé sur le copolymère 40/60, ainsi que sur l'homopolymère PDMMLA-H en suivant le protocole d'estérification de Steglich. De la même façon, la réaction a été effectuée sur une unité

monomère du PDMMLA, la β -lactone acide qui est la forme déprotégée de la β -lactone benzylique. L'analyse par RMN ^1H des polymères et du monomère, confirme que l'accrochage du cholestérol a été effectué avec succès. Le pourcentage de greffage sur le copolymère 40/60 est bien de 10% comme souhaité et de 100% sur l'homopolymère PDMMLA-H. Par la suite, le greffage du Paclitaxel sur les polymères a permis d'en fixer 10% sur le PDMMLA 40/60 et seulement 55% sur le PDMMLA-H, à cause de son encombrement stérique.

Le greffage covalent du Paclitaxel sur le copolymère 40/60 est particulièrement important, car le produit de cette réaction, le PDMMLA-PTX 30/10/60, est le candidat proposé pour les applications biomédicales.

La suite du projet porte donc sur l'analyse des différents aspects du copolymère 40/60 sur lequel le greffage du Paclitaxel a été réalisé, du produit de greffage PDMMLA-PTX 30/10/60 et du PLA qui est un biopolymère approuvé et utilisé dans différents domaines biomédicaux. La comparaison des résultats entre ces trois polyesters permet dans un premier temps d'observer les effets du greffage chimique sur les différentes propriétés physicochimiques, puis de voir les similitudes et les différences entre le terpolymère et le PLA.

Le premier aspect étudié est donc les propriétés physicochimiques de surface, avec l'adhésion protéique sur les trois polymères en utilisant la même technique que pour les copolymères 10/90, 20/80 et 30/70. Les résultats montrent tout d'abord que l'hydrophilie de surface du terpolymère 30/10/60 est considérablement plus faible comparée à celle du copolymère 40/60, ce qui indique que le greffage du Paclitaxel apporte de l'hydrophobie au polymère. La surface du terpolymère semble hydrophobe, comme celle du PLA. L'adhésion des protéines montre également le même profil global sur le terpolymère et le PLA.

En parallèle, la rugosité de surface est examinée par la technique de profilométrie. Les valeurs de R_a représentant la rugosité moyenne de la surface par deux méthodes de revêtement, le *dip coating* et le *spin coating*, montrent que les trois polymères ont une surface lisse.

Ces résultats confirment que le nouveau terpolymère est comparable au PLA en termes de propriétés de surface. Une étude plus approfondie de la surface peut être envisagée par d'autres techniques comme la microscopie à force atomique (AFM) afin d'analyser la rugosité de surface avec plus de précision.

Des images de stent ont été enregistrées par la microscopie optique dans le but d'observer la surface du stent avant et après revêtement par le terpolymère. Afin d'obtenir des images plus précises et voir davantage de détails, des images par microscopie électronique à balayage (MEB) ou par microscopie électronique en transmission (MET) devront être enregistrées. La

technique MEB permettra également de mesurer l'épaisseur du film polymère déposé sur la surface du stent.

Le second aspect étudié après le greffage est la libération du Paclitaxel greffé avec l'incubation du terpolymères dans trois solutions différentes : 1) PBS, 2) PBS/estérase, 3) PBS/lipase. Cette étude *in vitro* est réalisée dans le but de déterminer le profil et la cinétique de libération du Paclitaxel au cours du temps. Les résultats montrent que les courbes de concentration cumulée du Paclitaxel ont une tendance linéaire, indiquant que la libération du Paclitaxel suit une cinétique d'ordre zéro dans les trois cas. Ces résultats se révèlent très encourageants, car une cinétique de libération d'ordre zéro est le cas idéal pour maintenir une concentration constante de médicament dans l'organisme pour une période prolongée. Afin de confirmer ces premiers résultats et valider l'approche employée, il sera nécessaire de reproduire cette expérience dans les mêmes conditions, en coprésence des enzymes utilisées, voire d'autres enzymes, ou encore dans du sérum humain.

Enfin, le dernier aspect analysé est le comportement *in vitro* des cellules HUVECs vis-à-vis des trois polymères mentionnés. Les résultats de l'étude de cytotoxicité par le dosage de la LDH permettent de voir que le niveau de toxicité du PDMMLA-PTX 30/10/60 est légèrement plus élevée que celle du PDMMLA 40/60. Néanmoins, il reste proche et comparable à celui du PLA et devient même plus faible à 72h et 96h de culture. D'autre part, l'étude du *spreading* montre que l'étalement des HUVECs sur la surface du PDMMLA-PTX 30/10/60 est plus marqué, comparé au PDMMLA 40/60 et au PLA. Ces résultats s'avèrent donc positifs et encourageants et nécessitent davantage d'analyses pour valider l'utilisation du PDMMLA-PTX 30/10/60 comme revêtement bioactif de stents.

Si les copolymères de PDMMLA jusqu'à 30% d'hydrophilie ne présentent pas de solubilité dans l'eau, le PDMMLA 40/60 est soluble en milieu aqueux à cause de la présence de 40% de groupements acide carboxylique. Cela indique que l'augmentation du pourcentage d'hydrophilie au-delà de 30% rend le copolymère hydrosoluble. Après le greffage de 10% de Paclitaxel, le polymère devient plus hydrophobe et insoluble dans l'eau, mais il montre d'autres inconvénients en termes de propriétés mécaniques. En effet, lorsqu'on élabore un film polymère avec le PDMMLA-PTX 30/10/60, on ne rencontre pas de difficultés pour le préparer et recouvrir des surfaces telles que les plaques en verre ou métalliques, ou encore les stents. Le revêtement reste sur la surface à l'air ambiant sans subir de déformation. Cependant, le comportement du terpolymère change lorsqu'il est mis en contact avec une solution aqueuse, telle que le PBS (pour les études de la libération) ou encore le milieu de culture (pour les études

du comportement cellulaire). Le film polymère subit des craquelures, se décolle de la plaque et part en suspension dans le milieu aqueux au bout de quelques heures d'incubation. Ce comportement du terpolymère étant problématique pour son utilisation en tant que revêtement de stents, il suggère la nécessité d'améliorer ses propriétés mécaniques. L'aspect viscoélastique du polymère demande une étude approfondie afin de comprendre l'origine de ce caractère fragile du PDMMLA-PTX 30/10/60 en solution. La fragilité et les craquelures formées sur le film polymère ont engendré des difficultés dans la réalisation des expériences biologiques, notamment pour les tests d'étalement cellulaire. Il est donc nécessaire de trouver des stratégies pour améliorer les propriétés mécaniques de ce dernier.

Comme évoqué précédemment, le copolymère 40/60 sur lequel le greffage a été effectué présente un niveau d'hydrophilie élevé au point d'être soluble dans une solution aqueuse. Le premier pas dans l'optimisation du terpolymère pourrait donc passer par le choix d'un autre copolymère support pour accueillir le principe actif. Le greffage du Paclitaxel pourrait par exemple être effectué sur le copolymère 30/70 au lieu du copolymère 40/60.

Une autre possibilité serait de greffer une quantité moins importante de Paclitaxel, par exemple de l'ordre de 5%. Cela diminuerait également sa durée de libération, compte tenu des résultats de notre étude, qui indiquent que le Paclitaxel ne se libère pas intégralement au bout de quinze semaines d'incubation. Une quantité moindre en Paclitaxel pourrait probablement améliorer l'aspect viscoélastique du terpolymère et d'accélérer la cinétique de libération.

Le greffage chimique d'autres principes actifs, comme par exemple le sirolimus, pourrait également être mis en œuvre pour observer et comparer les effets du greffage de différents principes actifs, du point de vue des propriétés physicochimiques, mécaniques et biologiques.

Après avoir déterminé le pourcentage optimal d'hydrophilie et de principe actif pour le terpolymère, l'objectif sera de réaliser des expériences biologiques *in vitro* et *in vivo* afin de confirmer les bons effets du nouveau biopolymère sur l'organisme et sur la prévention de la resténose intra-stent.

Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes

Les produits chimiques ont été fournis par Sigma Aldrich, Alfa Aesar et Thermo Fisher. Toutes les commandes de solvants ont été effectuées auprès de Carlo Erba et utilisées sans modification.

Les plaques en verre Menzel-Glässer de dimension $75 \times 25 \times 1.0$ mm ont été fournies par la société Thermo Scientific. Les plaques ont été coupées en deux sur la largeur pour réaliser les expériences d'adhésion.

Les plaques métalliques constituées d'un alliage de cobalt-chrome (Co/Cr) ont été fabriquées et coupées sur mesure par la société GoodFellow. Les plaques sont composées d'un mélange de métaux (Co 50%/ Cr 20%/ W 15%/ Ni 10%/ Fe 3%/ Mn 2%) de dimension $10 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ et d'épaisseur 0.25 mm.

Les solvants anhydres ont été préparés par distillation. La distillation du THF a été réalisée sur sodium, en présence de benzophénone. Toutes les réactions avec les solvants anhydres ont été effectuées sous un flux de gaz de diazote (N_2). Toute la verrerie utilisée dans ces réactions a été séchée pendant 24h dans une étuve à 100°C .

Chromatographie sur couche mince (CCM) : La CCM a été effectuée en utilisant des plaques CCM recouvertes de gel de silice 60 F_{1254} de 2.5 mm d'épaisseur. La révélation des tâches des produits a été d'abord réalisée sous une lampe Ultra-Violet (UV) avec une longueur d'onde de 254 nm, puis au révélateur coloré à base de *p*-anisaldéhyde, obtenu en incorporant 93 mL d'éthanol absolu, 2.5 mL de *p*-anisaldéhyde, 3.5 mL d'acide sulfurique concentré et 1 mL d'acide acétique concentré.

La Chromatographie Flash a été réalisée sur une colonne chromatographique remplie de gel de silice (C-C 35-70 μm , 60 Å).

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : L'enregistrement des spectres RMN a été effectué sur un spectromètre BRUKER AM-400 MHz, en utilisant du chloroforme deutéré (CDCl_3) ou de l'acétone deutéré (CD_3COCD_3) selon la solubilité de l'échantillon analysé. Les déplacements chimiques (δ) des pics détectés sont donnés en partie par million (ppm). Les multiplicités sont indiquées comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet).

Spectroscopie Infrarouge ou « Fourier Transform Infrared spectroscopy » (FTIR) : Les spectres IR ont été enregistrés en utilisant un spectromètre AVATAR 370 FT-IR Thermo

Nicolet OMNI-sampler, ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Les bandes d'absorption sont données en cm^{-1} .

Température de fusion T_f : Le point de fusion des composés solides a été déterminé avec l'appareil de point de fusion Stuart SMP11.

Chromatographie par exclusion stérique ou « Size Exclusion Chromatography » (SEC) : La masse molaire absolue des polymères est déterminée par la SEC à température ambiante. L'appareil de chromatographie d'exclusion stérique à haute performance (HPSEC) est couplé à un détecteur de diffusion de lumière laser multi-angle (MALLS), un viscosimètre et un détecteur à indice de réfraction différentiel (dRI). Le THF est utilisé comme phase mobile après filtration à travers une membrane PTFE 0.2 μm (Millipore, Billerica, USA), il est dégazé (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto Japan) et élué à un débit de 0.5 mL/min (LC10Ai Shimadzu, Kyoto Japan). L'injecteur automatique (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto Japan) injecte un volume de 100 μL d'échantillon. La phase stationnaire est une colonne constituée d'un gel de divinylbenzène. Le photomètre MALLS, un miniDawn TREOS de Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) est équipé d'une cellule de silice fondue et d'un laser Ga-As ($\lambda = 665.8 \text{ nm}$). L'ensemble des données collectées, la diffusion de lumière (LS) et l'indice de réfraction (dRI) ont été analysés à l'aide du logiciel Astra v6.0.6. Les masses molaires ont été obtenues avec une méthode Zimm d'ordre 1.

HPLC phase inverse C18 : Le profil de la libération du PTX est suivi par HPLC à phase inverse (RP-HPLC). Cette technique est constituée d'un système Waters 2695 HPLC (Milford, MA, USA) intégré à une colonne, un auto-échantillonneur et une pompe. Le détecteur est Waters 2996 PDA (Milford, MA, USA). Empower Pro@5.0 contrôle l'équipement, ainsi que l'intégration des pics sur le chromatogramme. La colonne analytique est une Purospher® STAR (250 \times 4.6 mm i.d, 5 μm) endcapped RP-HPLC column (Merck, Darmstadt, Germany). L'acétonitrile (ACN), et l'eau déionisée sont filtrés en utilisant le Millipore Milli-Q®Integral System (Molsheim, France).

Analyses thermogravimétriques ou « ThermoGravimetric Analysis » (TGA) : La température de dégradation thermique T_d des polymères a été mesurée par un analyseur TGA Q50. La plage de température a été réglée de -30°C à 200°C avec une vitesse de chauffage de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sous atmosphère inerte (flux de N_2).

Calorimétrie différentielle à balayage ou « Differential Scanning Calorimetry » (DSC) : La température de transition vitreuse (T_g) des échantillons a été mesurée en utilisant la technique de DSC sur un analyseur DSC Q2000. Les polymères ont été placés dans le four et chauffés de 25°C à 190°C avec une vitesse de chauffage de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ (la température finale

peut varier pour différents polymères en fonction des valeurs de T_d mesurées par TGA). Le cycle de chauffage a été répété deux fois et la valeur de T_g a été collectée à partir du point d'inclinaison sur la deuxième courbe de chauffage.

Mesures d'angle de contact en mode dynamique ou « Dynamic Contact Angle » (DCA) : Les forces d'immersion de la surface des polymères ont été enregistrées à l'aide d'un tensiomètre à balance de Wilhelmy (K100MK2 de Krüss GmbH), connecté à un ordinateur pour la mesure et l'analyse de la force de surface.

Lyophilisation : La lyophilisation des échantillons a été réalisée en utilisant le lyophilisateur « Cryotec, Cosmos ». Les échantillons préalablement congelés à -80°C ont été placés dans le lyophilisateur et mis sous vide afin de réaliser la sublimation du solvant. La pression dans le piège atteint 0.13 mbars (20×10 mTorr) et la température descend jusqu'à -85°C .

Étude de surface par profilométrie : La rugosité de surface et l'épaisseur des films polymères sur les plaques ont été déterminées grâce à un profilomètre Alpha-Step IQ produit par KLA-Tenkor, composé d'un boîtier de mesure piloté par un ordinateur.

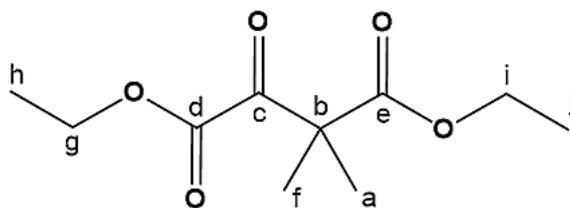
Microscopie optique à réflexion : Les images des stents ont été enregistrées par le microscope optique LEICA DM 8000 M, possédant des objectifs achromatiques à puissance de champ élevé (N plan) avec un grossissement de $5\times$ (ouverture numérique (ON) = 0.1), $10\times$ (ON = 0.25), $20\times$ (ON = 0.40), $50\times$ (ON = 0.90), $100\times$ (ON = 1.25). L'image de l'objet observé est envoyée sur un écran d'ordinateur *via* une caméra, LEICA MC 190 HD, 10 mégapixels, et visualisée par le logiciel du microscope.

2. Modes opératoires

2.1. Synthèse chimique des monomères et polymères^{1,2}

- **2-méthyl-2-oxalpropionate de diéthyle [1]**

29.62 g (0.26 mol, 1.1 éq.) de tert-butylate de potassium (tBuOK) sont dissous dans 1500 mL de toluène et mis sous agitation. 45 mL de 2-oxalpropionate de diéthyle (0.24 mol, 1 éq.) y sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. Parallèlement, 5.0 g (19 mmol, 0.08 éq.) d'éther couronne 18-Crown-6 sont dissous dans un minimum de toluène puis, ajoutés goutte à goutte au mélange précédent. Ensuite, 44.5 mL (0.72 mol, 3 éq.) d'iodométhane (CH₃I) sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 12h. Après réaction, 150 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel et la phase organique est lavée avec 3×150 mL d'eau, puis séchée sur sulfate de sodium (Na₂SO₄). Les phases aqueuses sont réunies et extraites avec 2 × 100 mL d'éther di-éthylique. Le solvant des phases organiques est séché sur Na₂SO₄, puis évaporé à l'évaporateur rotatif. Le produit [1] est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 92%.



[1]

 $M = 216.08 \text{ g/mol}$

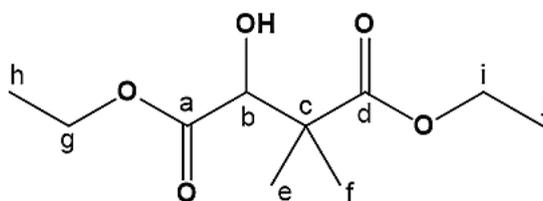
RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃, δ_H (ppm)) : 1.19 (t, 3H, $J_{\text{H}_i\text{-H}_j} = 7.2 \text{ Hz}$, H_j), 1.31 (t, 3H, $J_{\text{H}_h\text{-H}_g} = 7.2 \text{ Hz}$, H_h), 1.39 (s, 6H, H_a et H_f), 4.15 (q, 2H, $J_{\text{H}_i\text{-H}_j} = 7.2 \text{ Hz}$, H_i), 4.29 (q, 2H, $J_{\text{H}_g\text{-H}_h} = 7.2 \text{ Hz}$, H_g).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃COCD₃, δ_C (ppm)) : 14.33 (C_j), 22.26 (C_h), 28.01 (C_a et C_f), 53.39 (C_b), 61.05 (C_i), 62.65 (C_g), 161.22 (C_c), 173.02 (C_e), 192.67 (C_d).

- **3,3-diméthylmalate de diéthyle [2]**

46.3 g (0.21 mol, 1 éq.) du produit [1] sont dissous dans 250 mL d'EtOH absolu. 3.97 g (0.105 mol, 0.5 éq.) de borohydure de sodium (NaBH₄) sont ensuite introduits par petites portions à 0°C sous forte agitation. Le mélange est agité pendant 3h à température ambiante. 150 mL d'eau distillée sont ajoutés afin de neutraliser le NaBH₄ en excès. La solution est ensuite

neutralisée avec du HCl 6 M, puis, l'EtOH est éliminé à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite avec 3×100 mL d'éther di-éthylique, puis les phases organiques sont réunies, lavées avec 2×100 mL de saumure, et séchées sur Na₂SO₄. Après élimination des solvants, le produit est séché sous vide pendant 12h. Le produit de couleur jaune pâle sous forme d'une huile est alors obtenu avec un rendement de 78%.



[2]

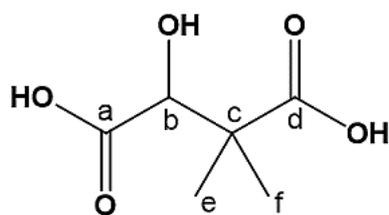
 $M = 218.12$ g/mol

RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃, δ_H (ppm)) : 1.12 (s, 3H, H_f), 1.21 (s, 3H, H_e), 1.23 (t, 6H, $J_{H_j-H_i} = J_{H_g-H_h} = 7.1$ Hz, H_h et H_j), 4.12 (m, 4H, $J_{H_i-H_j} = J_{H_g-H_h} = 7.1$ Hz, H_i et H_g), 4.16 (d, 1H, H_b).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃COCD₃, δ_C (ppm)) : 14.39 et 14.44 (C_j et C_h), 20.22 (C_e), 22.37 (C_f), 46.2 (C_c), 61.04 (C_i), 61.66 (C_g), 75.9 (C_b), 173.20 (C_d), 175.67 (C_a).

• Acide 3,3-diméthylmalique (diacide) [3]

103.66 g (0.75 mol, 6 éq.) de carbonate de potassium (K₂CO₃) sont solubilisés dans 500 mL d'eau et introduits dans un ballon contenant 27.4 g (0.12 mol, 1 éq.) du produit [2] à l'aide d'une ampoule à brome. Après addition, l'ampoule à brome est remplacée par un réfrigérant et le mélange réactionnel est porté à reflux à 120-130°C pendant 5h. Ensuite, le bain d'huile est retiré et le mélange est revenu à température ambiante. La solution est alors acidifiée avec du HCl 6 M jusqu'à pH = 1-2. L'eau est ensuite évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Un solide sous la forme d'une poudre blanche est obtenu. Ce dernier est séché à l'étuve, réglée à 50°C pendant 24h. Après séchage, une quantité suffisante d'acétate d'éthyle est ajoutée à ce solide afin de solubiliser le produit souhaité. Le KCl formé, insoluble dans l'acétate d'éthyle, est éliminé par filtration. Le solvant est alors évaporé et une huile est obtenue. Solubilisée dans un minimum d'acétonitrile (1-2 mL), cette huile se cristallise avec l'ajout d'une quantité suffisante de chloroforme froid. Le mélange est alors filtré sur fritté et une poudre blanche est obtenue avec un rendement de 85%. T_f = 122°C.



[3]

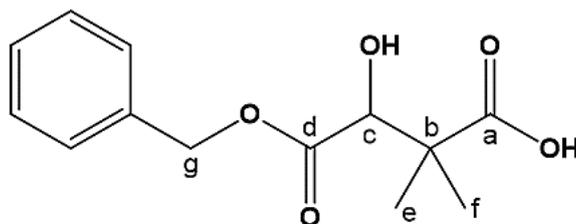
 $M = 164.14 \text{ g/mol}$

RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃, δ_H (ppm)) : 1.20 (s, 3H, H_f), 1.24 (s, 3H, H_e), 4.42 (s, 1H, H_b).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃COCD₃, δ_C (ppm)) : 20.18 et 21.39 (C_e et C_f), 46.16 (C_b), 75.02 (C_d), 173.55 (C_a), 176.83 (C_a).

• **2,2-diméthyl-3-benzyloxycarbonyl-3-hydroxypropanoïque (monoester benzylique) [4]**

5.01 g (0.03 mol, 1 éq.) de diacide [3] sont introduits dans un ballon et placés sous atmosphère inerte. Le ballon est refroidi en utilisant un bain de glace et 13.9 mL (0.09 mol, 3.3 éq.) d'anhydride trifluoroacétique (TFAA) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une canule. Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 minutes à 0°C, puis à température ambiante pendant 2h30. L'excès du TFAA et l'acide trifluoroacétique (TFA) formé sont alors évaporés, puis le mélange est remis sous atmosphère inerte et 3.10 mL (0.03 mol, 1 éq.) d'alcool benzylique (PhCH₂OH) sont ajoutés. Le mélange est laissé sous flux d'azote pendant 5 minutes avant de le laisser sous agitation pour la nuit. Après réaction, 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase organique est lavée avec 3 × 100 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) saturée. Les phases aqueuses obtenues sont acidifiées avec du HCl 6 M (pH = 1-2) et extraites avec 3 × 60 mL d'acétate d'éthyle. Les différentes phases organiques sont alors regroupées et séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le monoester benzylique [4] est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 88%. R_f = 0.3 (Cyclohexane/acétate d'éthyle 7:3), T_f = 98°C.



[4]

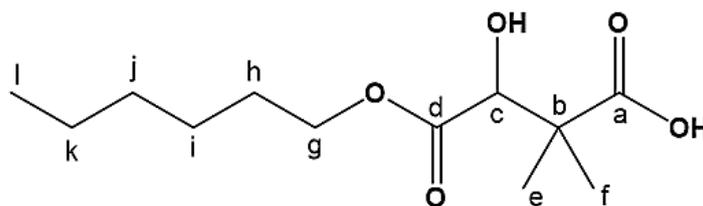
 $M = 252.26 \text{ g/mol}$

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 1.16 (s, 3H, H_f), 1.22 (s, 3H, H_e), 4.46 (s, 1H, H_c), 5.18 (d, 2H, $J = 2.8$ Hz, H_g), 7.36 (m, 5H, H_{Ph}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 20.98 et 22.05 (C_e et C_f), 46.90 (C_b), 67.32 (C_g), 76.10 (C_c), 129.21 et 137.00 (C_{Ph}), 173.13 et 176.80 (C_a et C_d).

• **Acide 2,2-diméthyl-3-hexyloxy-carbonyl-3-hydroxypropanoïque (monoester hexylique) [5]**

5.01 g (0.03 mol, 1 éq.) de diacide [3] sont introduits dans un ballon et placés sous atmosphère inerte. Le ballon est refroidi en utilisant un bain de glace et 14.0 mL (0.09 mol, 3.3 éq.) de TFAA sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une canule. Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 minutes à 0°C , puis à température ambiante pendant 2h30. L'excès du TFAA et le TFA formé sont alors évaporés, puis le mélange est remis sous atmosphère inerte et 3.74 mL (0.03 mol, 1 éq.) d'alcool hexylique (hexan-1-ol) sont ajoutés. Le mélange est laissé sous flux d'azote pendant 5 minutes avant de laisser sous agitation pour la nuit. Après réaction, 100 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés. La phase organique est lavée avec 3×100 mL d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) saturée. Les phases aqueuses obtenues sont acidifiées avec du HCl 6 M ($\text{pH} = 1-2$) et extraites avec 3×60 mL d'acétate d'éthyle. Les différentes phases organiques sont alors regroupées et séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Le monoester hexylique [5] est obtenu sous la forme d'une huile avec un rendement de 82%. $R_f = 0.3$ (Cyclohexane/acétate d'éthyle 7 : 3).



[5]

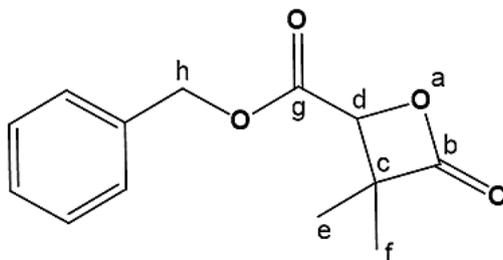
 $M = 246.50$ g/mol

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.88 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H_l), 1.16 (s, 3H, H_f), 1.22 (s, 3H, H_e), 1.34 (m, 6H, H_j , H_i , H_h), 1.62 (m, 2H, H_k), 4.14 (t, 2H, $J = 6.64$ Hz, H_g), 4.39 (s, 1H, H_c).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 14.26 (C_l), 20.80 (C_e), 22.09 (C_f), 23.16 (C_k), 26.25 (C_j), 29.24 (C_i), 32.13 (C_h), 46.83 (C_b), 65.74 (C_c), 76.03 (C_g), 173.33 (C_a), 176.96 (C_d).

- **4-benzyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone benzylique) [6]**

6.63 g (25.3 mmol, 1 éq.) de triphénylphosphine (PPh₃) et 6.41 g, (25.3 mmol, 1 éq.) de monoester benzylique [4] sont placés sous atmosphère inerte, puis solubilisés dans 100 mL de THF anhydre. 5.11 mL (25.3 mmol, 1 éq.) de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) sont ensuite solubilisés dans 50 mL de THF anhydre et ajoutés au mélange précédent à l'aide d'une canule. Le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 30 minutes, puis à température ambiante pendant 2h30. Après réaction, 70 mL d'éther di-éthylique froid sont ajoutés au produit afin de précipiter l'oxyde de triphénylphosphine (O=PPh₃). Ce précipité est ensuite éliminé par filtration. La purification du produit est effectuée sur une colonne de gel de silice (5 × 45 cm) avec un éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2. Après évaporation des solvants et séchage sous vide pendant 12h, la β -lactone benzylique [6] est obtenue sous la forme d'une huile avec un rendement de 68%. $R_f = 0.6$ (Cyclohexane/acétate d'éthyle 8:2).



[6]

 $M = 234.09 \text{ g/mol}$

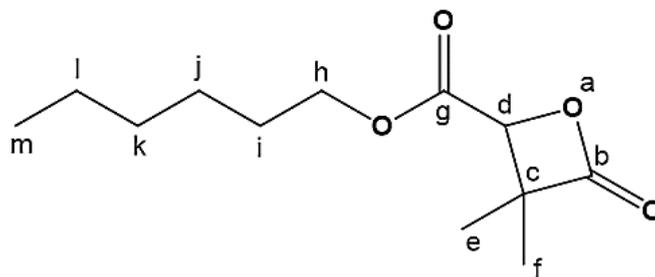
RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃, δ_H (ppm)): 1.18 (s, 3H, H_e), 1.51 (s, 3H, H_f), 4.96 (s, 1H, H_d), 5.29 (s, 2H, H_h), 7.4 (m, 5H, H_{Ph}).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃COCD₃, δ_C (ppm)): 17.91 et 22.01 (C_e et C_f), 58.62 (C_h), 68.0 (C_c), 77.83 (C_d), 129.58 et 136.53 (C_{Ph}), 168.27 (C_b), 173.93 (C_g).

- **4-hexyloxycarbonyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β -lactone hexylique) [7]**

6.16 g (23.5 mmol, 1 éq.) de PPh₃ et 5.81 g, (23.5 mmol, 1 éq.) de monoester hexylique [5] sont placés sous atmosphère inerte, puis solubilisés dans 100 mL de THF anhydre. 4.62 mL (23.5 mmol, 1 éq.) de DIAD sont ensuite solubilisés dans 50 mL de THF anhydre et ajoutés au mélange précédent à l'aide d'une canule. Le mélange est laissé sous agitation à 0°C pendant 30 minutes, puis à température ambiante pendant 2h30. Après réaction, 70 mL d'éther di-éthylique froid sont ajoutés au produit afin de précipiter le O=PPh₃ qui sera éliminé par filtration par la suite. L'éther est ensuite évaporé. La purification du produit est effectuée sur une colonne de gel de silice (5 × 45 cm) avec un d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 9:1. Après évaporation

des solvants et séchage sous vide pendant 12h, la β -lactone hexylique [7] est obtenue sous la forme d'une huile avec un rendement de 64%. $R_f = 0.4$ (Cyclohexane/acétate d'éthyle 9:1).



[7]

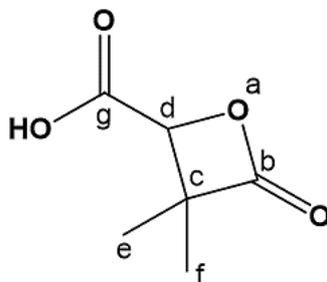
 $M = 228.28 \text{ g/mol}$

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.892 (t, 3H, $J = 7 \text{ Hz}$, H_m), 1.25 (s, 3H, H_f), 1.35 (m, 6H, H_j , H_k , H_l), 1.52 (s, 3H, H_e), 1.68 (m, 2H, H_i), 4.23 (td, 2H, $J = 6.68 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, H_h), 4.88 (s, 1H, H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 14.38 et 17.99 (C_e et C_f), 20.29 (C_m), 22.02 (C_l), 23.31 (C_k), 26.33 (C_j), 31 (C_i), 32.22 (C_h), 66.43 (C_c), 77.92 (C_d), 167.02 (C_b et C_g).

• **4-carboxyl-3,3-diméthyl-2-oxétanone (β - lactone acide) [8]**

500 mg (2.13 mmol, 1 éq.) de la β -lactone benzylique [6] sont placés dans un bicol muni d'un barreau aimanté. 50 mL d'acétone sont ajoutés afin de solubiliser la lactone. 50 mg (0.46 mmol, 10% en masse) de palladium sur charbon actif (Pd/C) sont ajoutés au mélange. L'air du milieu est aspiré à l'aide d'une pompe à vide et le ballon est placé sous flux de H_2 afin de réaliser la déprotection. Après 48h de réaction, le mélange est filtré sur une membrane PTFE 0.2 μm . Le solvant contenu dans le filtrat est évaporé afin de récupérer le produit final sous la forme d'un solide blanc, avec un rendement de 94%. $T_f = 48^\circ\text{C}$.



[8]

 $M = 144.04 \text{ g/mol}$

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)): 1.30 (s, 3H, H_e), 1.51 (s, 3H, H_f), 4.67 (s, 1H, H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)): 17.52, 21.90 (C_e et C_f), 58.50 (C_c), 78.10 (C_d), 168.35, 17.97 (C_b et C_g).

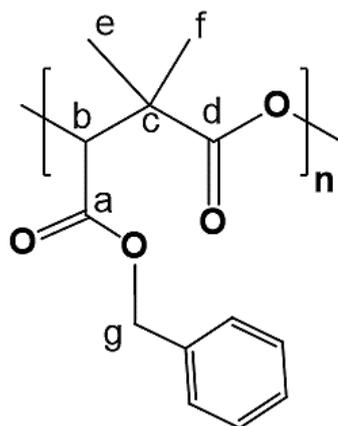
Polymérisation des lactones /Synthèse des polymères dérivés de PDMMLA

Afin d'effectuer cette réaction, le benzoate de tétraéthylammonium ($\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCOO}^-$) est utilisé en tant qu'amorceur pour débiter la polymérisation des lactones par voie anionique.³⁻⁵ Les masses des lactones et de l'amorceur à introduire sont calculées pour obtenir des polymères de masse molaire moyenne théorique de l'ordre de 20000 g/mol ou de 40000 g/mol selon les expériences. Toutes les manipulations sont effectuées sous flux de N_2 .

Une solution d'amorceur $\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCOO}^-$ dans l'éthanol anhydre est préparée avec une concentration de 40 mg/mL.

• Homopolymère benzylique PDMMLA-Bn [P1]

La synthèse du PDMMLA-Bn est effectuée en utilisant la β -lactone benzylique [6] comme monomère. Pour une masse molaire théorique de l'ordre de 40000 g/mol, 133.7 μL (5.35 mg, 0.021 mmol, 0.005 éq.) de la solution d'amorceur à 40 mg/mL sont prélevés, placés dans un ballon sous atmosphère inerte. Le ballon est alors placé sous vide afin d'évaporer l'éthanol et récupérer l'amorceur solide (1h au minimum). 1.01 g (4.27 mmol, 1 éq.) de β -lactone benzylique [6] sont placés dans un ballon également sous atmosphère inerte, puis solubilisés dans du THF anhydre fraîchement distillé. La β -lactone solubilisée est transférée dans le ballon contenant l'amorceur à l'aide d'une canule. La progression de la réaction est suivie par la spectroscopie IR, en observant la disparition de la bande de vibration C=O de la lactone (1834 cm^{-1}) avec le temps. Après réaction, 1 à 2 gouttes d'acide acétique sont ajoutées au mélange. Le THF est alors évaporé et le polymère récupéré est solubilisé dans un minimum d'acétone et précipité dans de l'éthanol absolu ($V_{\text{EtOH}} = 10 \times V_{\text{Acétone}}$). Le surnageant est éliminé et l'homopolymère PDMMLA-Bn [P1] obtenu est séché à l'air, puis sous vide. Le taux de conversion est de 100%. $M_n = 3.180 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 3.180 \times 10^4$ g/mol, $D = 1.000$.



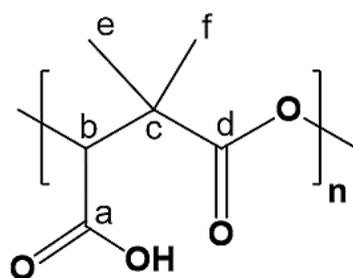
[P1]

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 1.22 (s, 3H, H_e), 1.28 (s, 3H, H_f), 5.18 (s, 2H, H_g), 5.35 (s large, 1H, H_b), 7.35 (m, 5H, H_{Ph}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 21.50, 30.58 (C_e et C_f), 45.80 (C_c), 67.75 (C_g), 76.81 (C_b), 129.15, 129.35, 136.10, 136.20 (C_{Ph}), 167.88, 173.61 (C_a et C_d).

- **Homopolymère acide PDMMLA-H ou PDMMLA 100/0 [P2]**

L'homopolymère acide est obtenu par l'hydrogénolyse des groupements benzyliques sur la chaîne latérale de l'homopolymère benzylique. Dans un tricol muni d'un barreau aimanté, 500 mg (3.47 mmol, 1 éq.) de l'homopolymère benzylique [P1] sont solubilisés dans 100 mL d'acétone et 500 mg (1 équivalent en masse) de Pd/C y sont ajoutés. Le système est placé sous vide dans un premier temps afin d'éliminer l'oxygène de l'air dans le ballon. Ensuite, il est mis en présence de H_2 . Après 48h de réaction, le mélange est filtré sur membrane PTFE 0.2 μm . Le filtrat est évaporé et l'homopolymère PDMMLA-H [P2] est récupéré avec 96% de rendement. $T_g = 69.9^\circ\text{C}$. $M_n = 1.431 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 1.432 \times 10^4$ g/mol, $D = 1.001$.



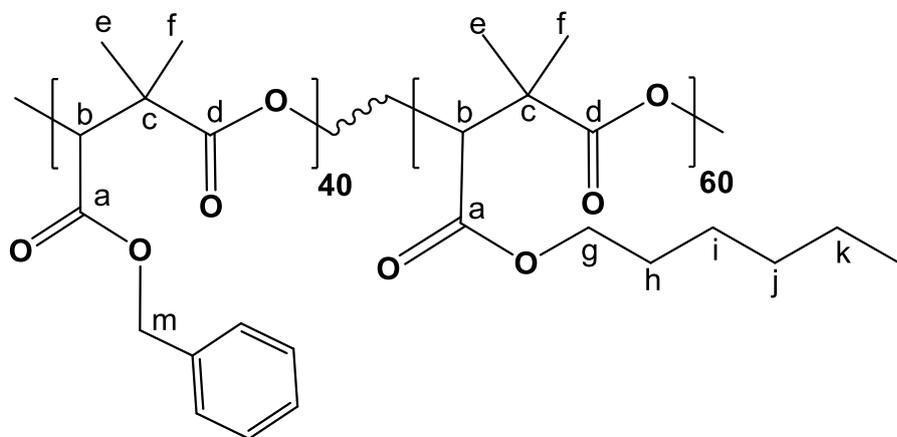
[P2]

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 1.26 (m, 6H, H_f et H_e), 5.24 (s large, 1H, H_b).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 20.64 (C_f , C_e), 44.91 (C_c), 76.04 (C_b), 168.34 (C_a), 173.14 (C_d).

• **Copolymère PDMMLABn_{40-co}-Hex₆₀ [P3]**

Suivant le même mode opératoire que pour [P1], le copolymère 40/60 est synthétisé en utilisant 370 μL (14.65 mg, 0.05 mmol, 0.005 éq.) d'amorceur, 1.60 g (7.09 mmol, 0.6 éq.) de β -lactone hexylique [8] et 1.09 g (4.67 mmol, 0.4 éq.) de β -lactone benzylique [6]. $M_n = 4.390 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 4.391 \times 10^4$ g/mol, $\text{Đ} = 1.000$.



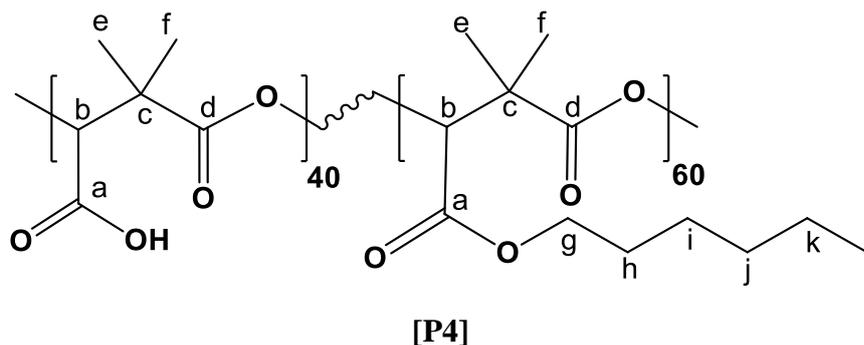
[P3]

RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.85 (s, 3H, H_l), 1.26 (m, 18H, H_e , H_f , H_k , H_j , H_i), 1.62 (s large, 2H, H_h), 4.14 (s large, 1H, H_g), 5.20 (s large, 2H, H_m), 5.33 (s large, 2H, H_b), 7.45 (m, 5H, H_{Ph}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)) : 14.48 (C_l), 23.33 (C_e et C_f), 26.35 (C_k), 29.33 (C_e et C_f), 32.26 (C_h , C_i , C_j), 46.00 (C_c), 66.26 (C_g), 67.88 (C_m), 77.12 (C_b), 129.38, 129.62, 136.45 (C_{Ph}), 168.25, 168.30, 173.65, 173.86 (C_a et C_d).

• **Copolymère PDMMLAH_{40-co}-Hex₆₀ (PDMMLA 40/60) [P4]**

L'hydrogénolyse des groupements benzyliques du copolymère 40/60 [P3] (2.3 g, 1 éq.) est effectuée en utilisant une quantité de Pd/C correspondant à 40% en masse totale de copolymère (920 mg). La réaction se poursuit en suivant le même protocole que pour [P2]. PDMMLA 40/60 [P4] est alors obtenu sous la forme d'un solide blanc. $T_g = 23.7^\circ\text{C}$, $T_d = 198.1^\circ\text{C}$. $M_n = 2.963 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 2.964 \times 10^4$ g/mol, $\text{Đ} = 1.000$.



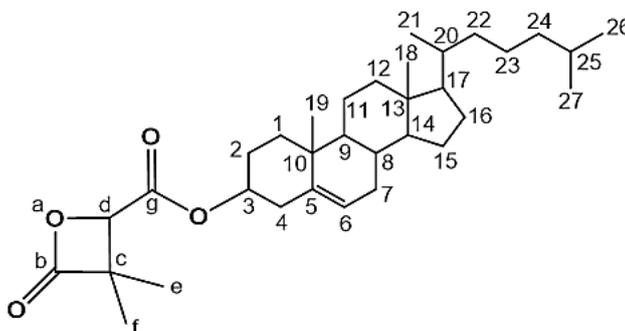
RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{H} (ppm)): 0.81 (s, 3H, H_i), 1.22 (m, 12H, H_f , H_e , H_k , H_j , H_i), 1.54 (s large, 2H, H_h), 4.06 (s large, 2H, H_g), 5.26 (s large, 1H, H_b).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3 , δ_{C} (ppm)): 13.99 (C_i), 22.49 (C_f , C_e), 26.31 (C_k), 32.22 (C_i , C_j , C_k), 45.98 (C_c), 66.28 (C_g), 77.14 (C_b), 168.26 (C_a), 173.76 (C_d).

2.2. Greffage covalent par le protocole d'estérification de Steglich ⁶

- β -lactone cholestérol [9]

100 mg (0.69 mmol, 1 éq.) de β -lactone acide [8], 267 mg (0.69 mmol, 1 éq.) de cholestérol, et 48 mg (0.39 mmol, 10% de la masse totale) de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) sont placés dans un ballon à 0°C sous atmosphère inerte et solubilisés dans 70 mL de THF fraîchement distillé. 150 mg (0.69 mmol, 1 éq.) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) sont séparément placés sous flux de N_2 et solubilisés dans du THF anhydre (20 mL) et ajoutés au mélange précédent à l'aide d'une canule. Après 15 minutes de réaction, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et agité pendant 48h. Après purification par chromatographie flash (éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 8 : 2), la β -lactone-cholestérol [9] est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 49%. $R_f = 0.85$, $T_f = 160^\circ\text{C}$. Analyse élémentaire : $\text{C}_{\text{Th}} = 50.00\%$, $\text{C}_{\text{Exp}} = 49.86\%$, $\text{H}_{\text{Th}} = 5.58\%$, $\text{H}_{\text{Exp}} = 6.21\%$.



[9]

$M = 512.39 \text{ g/mol}$

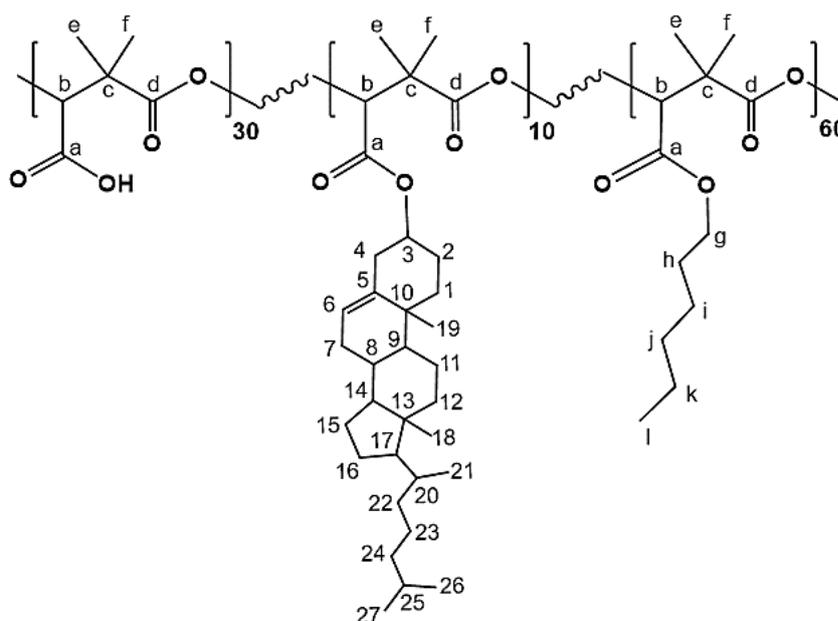
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.63 (s, 1H, H_{18}), 0.88 (dd, 6H, H_{26} et H_{27}), 0.93 (d, 3H, H_{21}), 0.98 (m, 1H, H_9), 1-1.62 (aliphatiques H_1 , H_2 , H_8 , H_{11} - H_{17} , H_{20} , H_{22} - H_{25}), 1.03 (s, 3H, H_{19}), 1.24 (s, 1H, H_e), 1.51 (s, 1H, H_f), 1.85 (m, 2H, H_7), 2.01 (m, 2H, H_{12}), 2.28 (m, 2H, H_4), 4.52 (s, 1H, H_d), 4.74 (m, 1H, H_3), 5.37 (d, 1H, H_6).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C} (ppm)) : 11.81 (C_{18}), 17.54 (C_e), 18.45 (C_{21}), 19.42 (C_{19}), 21.09 (C_{11}), 22.07 (C_f), 22.58 (C_{27}), 22.84 (C_{26}), 23.84 (C_{15}), 24.31 (C_{23}), 28.03 (C_{16}), 28.25 (C_{25}), 31.66 (C_7), 31.90 (C_8), 35.80 (C_{10}), 36.20 (C_{20}), 36.51 (C_{22}), 37.26 (C_1), 39.53 (C_{12}), 39.78 (C_{24}), 42.30 (C_{13}), 42.32 (C_4), 50.13 (C_9), 56.11 (C_{14}), 57.72 (C_c), 56.65 (C_{17}), 71.81 (C_3), 76.06 (C_d), 121.74 (C_6), 140.76 (C_5), 166.74 (C_b), 172.96 (C_g).

- **Greffage du cholestérol sur le copolymère [P4] : PDMMLA-Chol 10/30/60 [P8]**

Le même protocole de greffage est appliqué afin d'obtenir 10% de cholestérol sur le copolymère [P4] en utilisant les quantités de réactifs suivantes: 100 mg (0.43 mmol, 1 éq.) de PDMMLA 40/60 [P4], 16.69 mg (0.043 mmol, 0.1 éq.) de cholestérol, 12.61 mg (0.10 mmol, 10% de la masse totale) de DMAP et 8.90 mg (0.043 mmol, 0.1 éq.) de DCC dans 20 mL de THF anhydre. Après précipitation dans le cyclohexane, le PDMMLA-Chol 10/30/60 [P8] est obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 38%. $T_g = 25.7^\circ\text{C}$, $T_d = 178.1^\circ\text{C}$. $M_n = 2.684 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 2.693 \times 10^4$ g/mol, $\text{Đ} = 1.004$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.66 (s, 0.27H, H_{18}), 0.83 (m, 6.19H, H_{26} , H_{27} et H_1), 0.94 (d, 0.26H, H_{21}), 1.05 (m, 0.25H, H_9), 1.1-1.50 (30.09H, aliphatiques H_1 , H_2 , H_8 , H_{11} - H_{17} , H_{20} , H_{22} - H_{25} , H_e , H_f , H_k , H_i , H_j), 1.54 (s, 2.56H, H_h), 1.88 (m, 0.15H, H_7), 1.92 (m, 0.10H, H_{12}), 2.20 (m, 0.19H, H_4), 3.45 (m, 0.09H, H_3), 4.05 (m, 2.03H, H_g), 5.28 (d, 1.11H, H_6 et H_b).

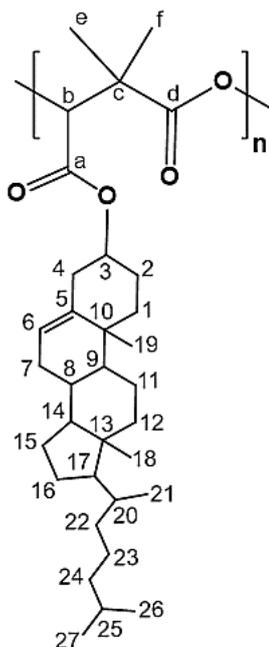


[P8]

RMN ^{13}C (100 MHz CDCl_3 , δ_c (ppm)) : 11.87 (C_{18}), 13.98 (C_1), 18.72 (C_f), 19.40 (C_{21}), 19.45 (C_{19}), 21.11 (C_{11}), 22.9 (C_e), 22.56 (C_{27}), 22.88 (C_{26}), 23.81 (C_{15}), 24.36 (C_{23}), 25.40 (C_j), 28.10 (C_{16}), 28.24 (C_{25}), 28.39 (C_k), 29.72 (C_i), 30.32 (C_h), 31.31 (C_7), 31.93 (C_8), 35.78 (C_{10}), 36.19 (C_{20}), 36.53 (C_{22}), 37.23 (C_1), 39.52 (C_{12}), 39.80 (C_{24}), 42.19 (C_{13}), 42.37 (C_4), 45.20 (C_c), 50.09 (C_9), 56.14 (C_{14}), 59.76 (C_{17}), 65.91 (C_g), 72.06 (C_3), 76.06 (C_b), 121.76 (C_6), 140.71 (C_5), 167.73 (C_a), 173.12 (C_d).

- **Greffage du cholestérol sur l'homopolymère [P2], PDMMLA-Chol [P9]**

Le greffage du cholestérol sur l'homopolymère acide [P2] est réalisé en suivant le même mode opératoire que pour le produit [9] en utilisant les quantités de réactifs suivantes : 40 mg (0.27 mmol, 1 éq.) de PDMMLA-H [P2], 104 mg (0.27 mmol, 1 éq.) de cholestérol, 20 mg (0.16 mmol, 10% de la masse totale) de DMAP et 56 mg (0.27 mmol, 1 éq.) de DCC dans 70 mL de THF anhydre. Le mélange a été agité sous atmosphère inerte pendant 48 h à température ambiante. Le THF est éliminé à la fin de la réaction. Le produit est ensuite solubilisé dans une petite quantité de chloroforme et purifié par précipitation dans le cyclohexane. PDMMLA-Chol [P9] est alors obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 46%. $T_g = 106.6^\circ\text{C}$, $T_d = 163.2^\circ\text{C}$. $M_n = 4.652 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 4.825 \times 10^4$ g/mol, $D = 1.037$.



[P9]

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.68 (s, 3H, H_{18}), 0.85 (d, 3H, H_{26}), 0.97 (d, 3.05H, H_{27}), 0.93 (d, 3.02H, H_{21}), 0.98 (m, 3H, H_{19}), 1-2.28 (35H, aliphatiques H_1 - H_4 , H_7 - H_9 , H_{11} - H_{17} , H_{20} , H_{22} - H_{25} , H_f , H_e), 3.40 (m, 0.96H, H_3), 5.23 (s, 1.05H, H_b), 5.37 (d, 1.04H, H_6).

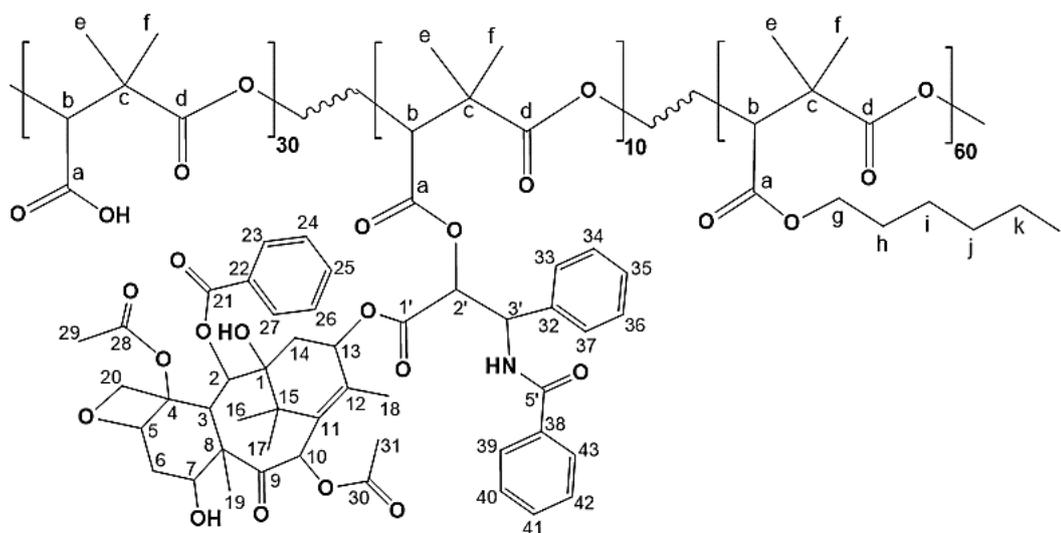
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C} (ppm)) : 11.94 (C_{18}), 18.86 (C_{21}), 19.47 (C_{19}), 18.90 (C_e), 21.11 (C_{11}), 22.53 (C_f), 22.61 (C_{27}), 22.90 (C_{26}), 23.86 (C_{15}), 24.32 (C_{23}), 28.07 (C_{16}), 28.30 (C_{25}), 31.57(C_7), 31.86 (C_8), 35.84 (C_{10}), 36.17 (C_{20}), 36.48 (C_{22}), 37.28 (C_1), 39.55 (C_{12}), δ_{C} 39.81 (C_{24}), 42.28 (C_{13}), 42.40 (C_4), 45.16 (C_c), 50.17 (C_9), 56.90 (C_{14}), 58.32 (C_{17}), 72.14 (C_3), 76.12 (C_b), 121.85 (C_6), 140.76 (C_5), 167.98 (C_a), 173.20 (C_d).

• **Greffage du PTX sur le copolymère [P4] : PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10]**

De même que pour les produits précédents, le greffage du Paclitaxel sur le PDMMLA 40/60 [P4] est réalisé en utilisant 600 mg (2.59 mmol, 1 équ.) de [P4], 221.1 mg (0.25 mmol, 0.1 équ.) de Paclitaxel, 87.30 mg (0.71 mmol, 10% de la masse totale) de DMAP et 53.40 mg (0.25 mmol, 0.1 équ.) de DCC dans 20 mL de THF anhydre. Le terpolymère PDMMLA 30/10/60 [P10] est alors obtenu avec un rendement de 50%. $T_g = 34.70$ °C, $T_d = 168.86$ °C. $M_n = 3.178 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 3.185 \times 10^4$ g/mol, $D = 1.002$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} (ppm)) : 0.87 (s, 3H, H_i), 1.24 (m, 18.06H, H_{16} , H_{18} , H_f , H_e , H_k , H_j , H_i), 1.61 (s, 2.05H, H_h), 1.67 (s, 0.3H, H_{17}), 1.79 (s, 0.29H, H_{19}), 1.86 et 2.51

(td, 0.27H, H_{6a} et H_{6b}), 2.23 (s, 0.34H, H₃₁), 2.26 (s, 0.3H, C₁-OH), 2.32 et 2.38 (m, 0.33H, H_{14a} et H_{14b}), 2.41 (s, 0.3H, H₂₉), 2.49 (d, 0.29H, C₇-OH), 3.77 (m, 0.11H, H₃), 4.12 (m, 2.13H, H_g et H_{20a}), 4.28 (d, 0.12H, H_{20b}), 4.39 (m, 0.11H, H₇), 4.80 (m, 0.12H, H_{2'}), 4.95 (dd, 0.12H, H₅), 5.34 (s, 1.32H, H_b), 5.66 (d, 0.12H, H₂), 5.78 (d, 0.12H, H_{3'}), 6.20 (t, 0.12H, H₁₃), 6.27 (s, 0.12H, H₁₀), 7.00 (d, 0.10H, N-H), 7.28 (m, 0.13H, H₃₅), 7.31 (m, 0.22H, H₃₄ et H₃₆), 7.42 (m, 0.21H, H₄₀ et H₄₂), 7.48 (m, 0.11H, H₄₁), 7.51 (m, 0.24H, H₃₃ et H₃₇), 7.52 (d, 0.24H, H₂₄ et H₂₆), 7.64 (t, 0.12H, H₂₅), 7.76 (d, 0.23H, H₃₉ et H₄₃), 8.15 (d, 0.21H, H₂₃ et H₂₇).



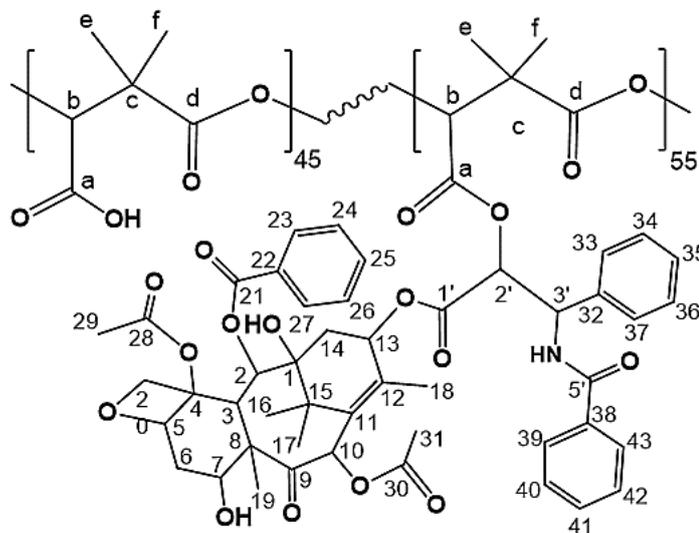
[P10]

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ_C (ppm)) : 9.58 (C₁₉), 13.98 (C₁), 14.83 (C₁₈), 20.87 (C₃₁), 21.82 (C₁₆), 22.48 (C_e, C_f), 22.60 (C₂₉), 25.39 (C_j), 26.80 (C₁₇), 28.38 (C_k), 29.69 (C_i), 30.31 (C_h), 35.60 (C₁₄), 35.62 (C₆), 43.15 (C₁₅), 45.18 (C_c), 45.64 (C₃), 55.25 (C_{3'}), 58.51 (C₈), 65.86 (C_g), 72.15 (C₇), 73.29 (C_{2'}), 74.76 (C₂), 74.91 (C₁₃), 75.62 (C₁₀), 76.50 (C_b), 77.29 (C₂₀), 78.93 (C₁), 81.06 (C₄), 84.43 (C₅), 127.07 (C₃₉ et C₄₃), 127.17 (C₃₃ et C₃₇), 128.29 (C₃₅), 128.68 (C₄₀ et C₄₂), 128.74 (C₂₄ et C₂₆), 129.96 (C₃₄ et C₃₆), 129.14 (C₂₂), 130.20 (C₂₃ et C₂₇), 131.99 (C₄₁), 133.06 (C₁₁), 133.55 (C₃₂), 133.74 (C₂₅), 137.92 (C₃₈), 142.07 (C₁₂), 166.94 (C_{5'}), 167.47 (C₂₁), 167.70 (C_d), 170.50 (C₂₈), 171.31 (C₃₀), 172.74 (C_{1'}), 173.15 (C_a), 203.65 (C₉).

• **Greffage du PTX sur l'homopolymère [P2] : PDMMLA-PTX 45/55 [P11]**

Suivant le protocole d'estérification de Steglich, le Paclitaxel est greffé sur le PDMMLA-H [P2] en utilisant les quantités de réactifs suivantes : 16.81 mg (0.12 mmol, 1 éq.) de [P2], 100 mg (0.12 mmol, 1 éq.) de Paclitaxel, 14.10 mg (0.11 mmol, 10% de la masse totale) de DMAP et 24.10 mg (0.12 mmol, 1 éq.) de DCC dans 20 mL de THF anhydre. Le produit final,

PDMMLA-PTX 45/55/0 [P11] est obtenu avec un rendement modeste de 41%. $T_g = 64.6^\circ\text{C}$, $T_d = 170.1^\circ\text{C}$. $M_n = 2.883 \times 10^4$ g/mol, $M_w = 2.974 \times 10^4$ g/mol, $D = 1.031$.



[P11]

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H} (ppm)) : 1.15 (m, 3.00H, H_{16}) 1.20 (m, 9.22H, H_{17} , H_f , H_e), 1.57 (s, 2.99H, H_{18}), 1.68 (s, 3.04H, H_{19}), 1.77 et 2.41 (td, 2H, H_{6a} et H_{6b}), 2.19 (s, 3.06H, H_{31}), 2.18 (s, 1.03H, $\text{C}_1\text{-OH}$), 2.32 et 2.38 (m, 2H, H_{14a} et H_{14b}), 2.40 (s, 3.06H, H_{29}), 3.71 (m, 1.03H, H_3), 4.10 (d, 1.02H, H_{20a}), 4.20 (d, 1.01H, H_{20b}), 4.30 (m, 1.03H, H_7), 4.70 (s, 1.03H, $\text{H}_{2'}$), 4.80 (dd, 1.06H, H_5), 5.25 (s, 0.69H, H_b), 5.59 (d, 1.09H, H_2), 5.73 (d, 1.06H, $\text{H}_{3'}$), 6.15 (t, 1.00H, H_{13}), 6.23 (s, 1.01H, H_{10}), 7.12 (d, 1.04H, N-H), 7.27 (m, 1H, H_{35}), 7.31 (m, 2H, H_{34} et H_{36}), 7.42 (m, 2H, H_{40} et H_{42}), 7.48 (m, 1H, H_{41}), 7.51 (m, 2H, H_{33} et H_{37}), 7.52 (d, 2H, H_{24} et H_{26}), 7.64 (t, 1H, H_{25}), 7.76 (d, 2H, H_{39} et H_{43}), 8.15 (d, 2H, H_{23} et H_{27}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C} (ppm)) : 9.60 (C_{19}), 14.80 (C_{18}), 20.85 (C_{31}), 21.87 (C_{16}), 22.51 (C_e , C_f), 22.61 (C_{29}), 26.77 (C_{17}), 35.58 (C_{14}), 35.63 (C_6), 43.15 (C_{15}), 45.16 (C_c), 45.66 (C_3), 55.23 ($\text{C}_{3'}$), 58.54 (C_8), 72.17 (C_7), 73.31 ($\text{C}_{2'}$), 74.77 (C_2), 74.94 (C_{13}), 75.66 (C_{10}), 76.48 (C_b), 77.30 (C_{20}), 78.91 (C_1), 82.00 (C_4), 84.44 (C_5), 127.10 (C_{39} et C_{43}), 127.13 (C_{33} et C_{37}), 128.32 (C_{35}), 128.72 (C_{40} et C_{42}), 128.77 (C_{24} et C_{26}), 129.16 (C_{22}), 129.93 (C_{34} et C_{36}), 130.19 (C_{23} et C_{27}), 132.03 (C_{41}), 133.06 (C_{11}), 133.53 (C_{32}), 133.77 (C_{25}), 137.98 (C_{38}), 142.10 (C_{12}), 166.91 ($\text{C}_{5'}$), 167.44 (C_{21}), 167.73 (C_a), 170.51 (C_{28}), 171.29 (C_{30}), 172.77 ($\text{C}_{1'}$), 173.20 (C_d), 203.66 (C_9).

2.3. Protocoles des analyses

- **Préparation des films de polymère pour la tensiométrie**

- **Copolymères 10/90 [P5], 20/80 [P6], et 30/70 [P7]** : les plaques en verre de dimension $75 \times 12.5 \times 1$ mm d'épaisseur sont lavées successivement à l'eau, au chloroforme, à l'acétone, et séchées à température ambiante, puis à 100°C . Les polymères sont solubilisés dans une petite quantité d'acétone ou de chloroforme (selon la solubilité de l'échantillon) afin d'obtenir une solution visqueuse, qui sera déposée sur la plaque jusqu'à 1 cm sur la longueur de la plaque. Puis, après le séchage complet de la première face, le dépôt est réalisé sur la deuxième face ($n = 3$ pour chaque expérience). Les plaques recouvertes de polymère sont alors séchées à température ambiante, puis à 37°C pendant une nuit afin d'obtenir des films visibles, lisses et homogènes.

- **Polymère commercial PLA et terpolymère-PTX 30/10/60 [P10]**: le dépôt de film de polymère est réalisé de la même manière que précédemment, sur les plaques métalliques en Co-Cr de dimension $10 \times 25 \times 0.25$ mm.

- **Préparation des solutions de protéines**

Toutes les solutions protéiques ont été préparées dans du PBS, à $\text{pH} = 7.4$, à 0.2% de la concentration totale des protéines plasmatiques, représentant la concentration physiologique de chaque protéine (BSA à $86 \mu\text{g/mL}$, fibrinogène à $6 \mu\text{g/mL}$, fibronectine et vitronectine à $0.6 \mu\text{g/mL}$ et syndécan-4 à $1 \mu\text{g/mL}$). La solution « Mix » a été préparée selon les proportions physiologiques, en mélangeant des volumes égaux de chaque solution protéique préalablement préparée.

- **Mesures de la force par DCA**

- **Expérience de blanc** : 10 cycles d'immersion/émersion des films polymères ont été réalisés dans une solution de PBS à $\text{pH} = 7.4$ grâce au tensiomètre à balance de Wilhelmy (figure 28).

- **Expérience avec les protéines** : Les 5 premiers cycles d'immersion/émersion sont réalisés dans une solution protéique (cycles 1 à 5 pour l'expérience d'adsorption) et les 5 derniers cycles sont réalisés dans une solution PBS (cycles 6 à 10 pour l'expérience de

rinçage/désorption). Chaque profil est comparé à celui du PBS seul obtenu avec le film polymère correspondant.

Pour toutes les expériences, la profondeur d'immersion et la vitesse d'immersion/émersion ont été réglées à 10 mm et 6 mm/min respectivement. Toutes les expériences ont été réalisées à 37°C.



Figure 28 : Photographie du tensiomètre à balance de Wilhelmy

La plaque est accrochée à la microbalance, située au-dessus de la cuve où on place le liquide de tension de surface connue.

- **Libération du Paclitaxel du terpolymère [P10]**

Pour cette expérience effectuée sur une période de quinze semaines, différentes solutions de PBS sont préparées : une solution de PBS (1x) pour l'expérience sans enzyme, une solution dans le PBS d'estérase (24 U/mg) et une solution dans le PBS de lipase (9.2 U/mg). Des suspensions du terpolymère PDMMLA-PTX 30/10/60 [P4] d'une concentration de 1 mg/mL (7 mg de polymère sont mis dans 7 mL de solution) sont alors préparées dans le PBS et dans les solutions d'enzymes et incubées à 37°C. Les solutions d'enzyme contiennent une quantité équivalente à 1 mg d'enzyme par 400 mg de polymère (concentration des solutions d'enzyme = 0.0025 mg/mL). Chaque échantillon est préparé en trois exemplaires (n = 3).

Des prélèvements du surnageant sont réalisées tous les deux jours pendant les deux premières semaines, puis une fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérience. Les surnageants

prélevés sont congelés à -80°C , puis lyophilisés. Le solide obtenu après lyophilisation est mis en solution dans de l'ACN de façon à obtenir une solution de 20 mg/mL. Cette solution est filtrée à travers une membrane PVDF afin de réaliser les mesures HPLC.

La libération du Paclitaxel est suivie par la technique HPLC en phase inverse (C18) couplé à un détecteur UV-visible. La phase mobile est un mélange d'ACN/H₂O 70 :30 avec un débit d'élution de 1 mL/min, et le volume injecté de chaque échantillon est de 100 μL . Le Paclitaxel est détecté à une longueur d'onde de 227 nm, avec un pic à 4.74 minutes.

La droite d'étalonnage du Paclitaxel est tracée à partir des valeurs de hauteur de pics HPLC en fonction de la concentration. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de 1 mg/mL dans l'ACN et des solutions filles sont préparées alors entre 3 et 100 $\mu\text{g/mL}$.

- **Nettoyage et traitement UV/Ozone (UV/O₃) des plaques métalliques**

Les plaques métalliques, les plaques en verre et les stents métalliques sont lavés successivement dans de l'acétone, de l'éthanol et de l'isopropanol durant 15 minutes chacun. Après séchage à l'air comprimé, les plaques et les stents sont placés dans le tiroir de l'appareil de traitement par UV/O₃ (figure 29) afin d'être stérilisés pendant 15 minutes avant de déposer le polymère sur leur surface. Cette étape permet d'éliminer toutes traces de couches organiques restantes à la surface et la rendre ainsi très propre.



Figure 29 : Photographie du nettoyeur UV/O₃

Les plaques sont placées dans le tiroir de l'appareil et stérilisées grâce au traitement UV/O₃

- **Revêtement des plaques métalliques**

Deux techniques sont employées afin de réaliser un film polymère sur les plaques métalliques pour les études de rugosité et d'épaisseur de film : le *spin coating* et le *dip coating*.

- *Spin coating*

Des solutions de PDMMLA 40/60 [P4], de PDMMLA-PTX 30/10/60 [P10] et de PLA d'environ 300 mg/mL dans le chloroforme sont préparées. La plaque métallique est placée sur le mandrin rotatif du *spin coater* de façon à couvrir toute la surface (figure 30). La vitesse de rotation est réglée à 4000 rpm, durant 1 minute. Le vide est établi afin de maintenir en place la plaque et la rotation est démarrée. 20 μ L de la solution de polymère sont alors déposées sur la plaque en rotation à l'aide d'une pipette. La rotation de la plaque à vitesse élevée permet donc d'étaler de manière homogène le polymère sur la plaque et obtenir un film.



Figure 30 : Photographie du *spin coater* avec l'écran de réglage

La plaque est placée sur le mandrin rotatif, situé au centre de la cuve de l'appareil pour effectuer le revêtement.

- *Dip coating*

La plaque est fixée sur le bras mobile du *dip coater* et placée au-dessus de la solution de polymère d'une concentration de 40 mg/mL dans laquelle elle sera immergée (figure 31). La vitesse de la descente de la plaque est réglée *via* un ordinateur à 15 mm/s, puis à 2 mm/s à proximité de la surface de la solution. Une fois immergée, la plaque est maintenue dans la solution pour une durée de trois minutes, puis retirée et laissée à l'air afin d'évaporer le chloroforme. Les deux faces de la plaque sont donc recouvertes de film de polymère.



Figure 31 : Photographie du *dip coater*

La plaque est fixée sur le bras mobile, au-dessus de la solution de polymère afin de réaliser le trempage.

- **Revêtement de stents**

Des stents en alliage Co-Cr ou acier inoxydable sont utilisés comme plateforme de revêtement. Les stents sont lavés dans l'acétone, l'éthanol et l'isopropanol en séquence pendant 15 minutes. Le recouvrement du stent est réalisé par son immersion dans une solution de 40 mg/mL de chaque polymère dans le chloroforme. La solution est filtrée à travers des filtres seringues de 0.2 μm . Le solvant est évaporé à température ambiante, puis à 37°C pendant une nuit.

- **Mesure de la rugosité de surface R_a et épaisseur du film polymère H**

La plaque recouverte de polymère par *spin-coating* ou *dip-coating* est placée sur le plateau du profilomètre de façon à se situer en dessous de la pointe de balayage (figure 32). La surface est alors balayée sur une longueur entre 700 et 1000 μm (700 μm pour l'épaisseur et 1000 μm pour la rugosité), avec une vitesse de 20 $\mu\text{m/s}$. Pour déterminer l'épaisseur de la couche déposée sur la plaque, des rayures sont réalisées sur le film polymère à l'aide d'une pince. Toutes les mesures sont réalisées trois fois ($n = 3$).

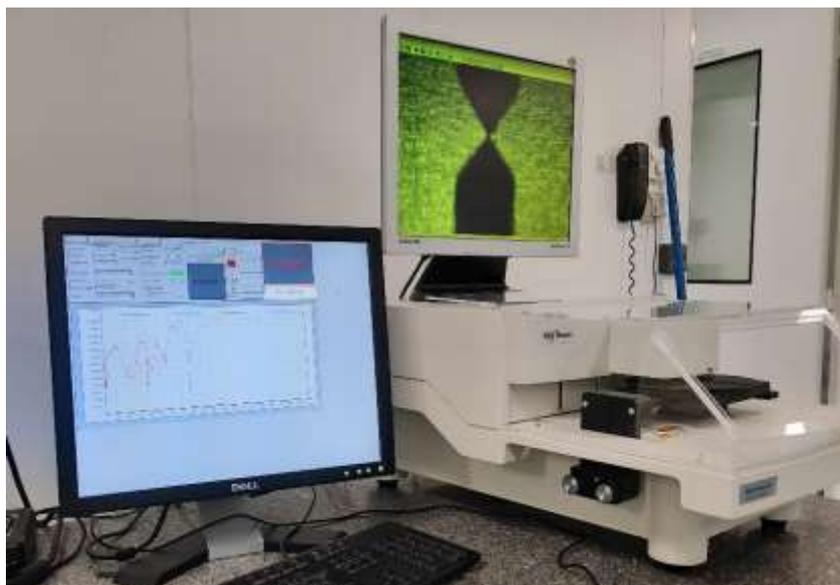


Figure 32 : Photographie du profilomètre

Une caméra est couplée au profilomètre reflétant à l'écran l'image de la pointe balayant la surface de l'échantillon.

- **Culture cellulaire**

Les cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines (HUVECs) (ATCC® CRL-1730TM) ont été cultivées dans du milieu de culture de base 2 de cellules endothéliales (ECBM2, réf C22211, Promocell) et complétées avec 12% de sérum de veau fœtal, 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF), 0.2 µg/mL d'hydrocortisone, 0.5 ng/mL de facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), 10 ng/mL de facteur de croissance basique (bFGF), 20 ng/mL de facteur de croissance insulinique (IGF-1), 1 µg/mL d'acide ascorbique et 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère contrôlée de 5% de CO₂.

- **Test de cytotoxicité par LDH des HUVECs sur les films polymère**

La prolifération des HUVECs est déterminée après 24h, 48h, 72h et 96h d'incubation après ensemencement cellulaire initial sur les différents films de polymère avec les milieux de culture cellulaire. Trois échantillons de chaque surface de polymère ont été utilisés pour chaque durée de prolifération et chaque expérience a été répétée trois fois sur différents passages cellulaires à des jours différents (n = 3). La cytotoxicité des polymères a été déterminée par la mesure de l'activité enzymatique de la (LDH) dans le milieu en utilisant un test colorimétrique LDH (CyQuant LDH Assay Kit) selon le protocole du fabricant. L'absorbance de la LDH a été mesurée à 490 nm.

- **Étalement des HUVECs sur les films polymères (*Spreading*)**

L'étalement des HUVECs a été réalisé sur les films des copolymères PDMMLA 40/60, PDMMLA-PTX 30/10/60 et PLA, en utilisant 8000 cellules par puits dans des plaques LabTek à 8 puits afin d'analyser les changements de forme et de taille des cellules individuelles. Après une durée d'incubation de 2h, le milieu cellulaire a été éliminé, les cellules ont été fixées en utilisant du paraformaldéhyde (PFA) 1%, lavées avec le PBS (1x), et perméabilisées à l'aide d'une solution de Triton X-100. Le cytosquelette (F-actine) et le noyau ont été colorés avec Alexa Fluor 546 Phalloïdine (diluée au 1/200) et 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (dilué au 1/1000) et observés au microscope à fluorescence. Les cellules ont été photographiées en utilisant un appareil photo numérique fixé sur le microscope à fluorescence (Nikon COOL PIX 8400, Japan). L'expérience a été répétée 2 fois sur différents passages cellulaires à des jours différents (n = 2).

Références

- [1] C. Barbaud, F. Abdillah, F. Fabienne, M. Guerrouache, P. Guérin, “Synthesis of new α,α',β -trisubstituted β -lactones as monomers for hydrolyzable polyesters” *Des. Monomers Polym.* 6 (4), 353–367, **2003**.
- [2] C. Barbaud, M. Guerrouache, P. Guérin, “Synthesis of novel α, α, β -Trisubstituted β -lactones” *Tetrahedron Lett.* 43, 9513–9515, **2002**.
- [3] C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, P. Guérin, “Synthesis of New Homopolyester and Copolyesters by Anionic Ring-opening Polymerization of α,α',β -Trisubstituted β -Lactones” *Macromol. Chem. Phys.* 205 (2), 199–207, **2004**.
- [4] F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guerin, C. Barbaud, “Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β -trisubstituted β -lactones and their characterizations” *Des. Monomers Polym.* 8 (1), 25–35, **2005**.
- [5] R. Belibel, I. Azzouz, C. Barbaud, “Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((S)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 54 (11), 1495–1507, **2016**.
- [6] B. Neises, W. Steglich, “Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids” *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 17 (7), 522–524, **1978**.

Annexes

Summary of the thesis

The objective of this thesis was to develop a polymer as a bioactive coating for bare metal stents, using poly([R,S]-3,3-diméthylmalic acid) (PDMMLA) derivatives in order to prevent intra-stent restenosis. The tailored synthesis of PDMMLAs from different α,α,β -tri-substituted β -lactones allows to obtain amphiphilic copolymers with adjustable hydrophilicity proportions, which can bring various changes to the polymer such as physicochemical, thermomechanical and viscoelastic properties, degradation kinetics and cell response.

During this thesis, different aspects of PDMMLA derivatives were analyzed. Surface properties of three PDMMLAs, with 10, 20, and 30% of hydrophilic -COOH groups (PDMMLA 10/90, PDMMLA 20/80 and PDMMLA 30/70) were studied. DCA technique was employed in order to study the protein adhesion on these three surfaces by measuring the surface force of each polymer, *vis-à-vis* different proteins (BSA, fibrinogen, fibronectin, vitronectin), and a transmembrane proteoglycan, syndecan-4.

The force F was measured during immersion of the polymer film in a protein solution for adsorption, and in PBS for desorption. Changes in F values indicate the adsorption and reorientation of the adsorbed proteins on the surface since these values represent the hydrophilicity/hydrophobicity levels of the surface. The results show that all studied proteins adhere with low F values on the PDMMLA 30/70 surface, meaning that they expose their hydrophobic moieties to the surface once adsorbed. The carboxylic acid groups which are more abundant on the copolymer 30/70, exist rather $-\text{COO}^-$ form at neutral pH and promote hydrophilic and ionic interactions and hydrogen bonds. These results, associated with previous studies, suggest the choice of 30% of hydrophilicity as the best percentage to maintain in the continuity of the project. The details and the results of this work have been published in 2020 in the journal "*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*".

The next stage was the study of a covalent grafting of molecules on PDMMLA, taking advantage of the presence of carboxylic acid groups. To maintain the validated 30% of hydrophilicity, the synthesis of a new PDMMLA copolymer with 40% hydrophilicity was carried out. Thus, the total percentage of -COOH would remain at 30% after grafting 10% of an active drug. This study was first carried out by grafting cholesterol as a model molecule, then by grafting Paclitaxel, with the aim of developing a new biopolymer with its active drug, intended for biomedical applications. The grafting was carried out following the Steglich esterification protocol on PDMMLA 40/60, and homopolymer PDMMLA-H. Likewise, the same reaction was carried out on a monomer unit of PDMMLA, the acidic β -lactone. NMR analyses show that cholesterol has been grafted successfully on the monomer and the polymers.

The grafting percentage was confirmed to be 10% on the copolymer 40/60 and 100% on the homopolymer. Once the grafting protocol and conditions were validated, the same protocol was applied using Paclitaxel, a currently used active drug, on PDMMLA 40/60 and PDMMLA-H. The grafting reaction on the copolymer 40/60 is particularly important in this work, for the final product is intended for biomedical use. Adding 10% of Paclitaxel to the copolymer results in the development of the terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60, which is studied in the continuity of this thesis. ^1H , ^{13}C NMR spectra, as well as 2D COSY, HSQC and HMBC spectra of the products confirm the esterification through the analysis of the corresponding functional groups' peaks. The first part of the results obtained in this work has been published in 2020, in the journal "*Royal Society of Chemistry Advances*".

After the covalent grafting process, a series of experiments was carried out on PDMMLA 40/60, PDMMLA-PTX 30/10/60, as well as on PLA. These studies are brought together to compare the results and observe the effects of adding Paclitaxel on PDMMLA 40/60, and the differences and similarities between the new terpolymer and PLA

The first aspect was the study of the physicochemical properties, with protein adhesion on these three polymers, using the same technique as for the copolymers 10/90, 20/80 and 30/70. The results show that the surface hydrophilicity of the terpolymer 30/10/60 is considerably lower than the copolymer 40/60. PDMMLA-PTX 30/10/60 reveals a hydrophobic surface like PLA. Protein adhesion also shows the same overall profile on terpolymer and PLA. In parallel, surface roughness of the polymers was examined by profilometry technique. The mean roughness values (R_a), for two coating methods, dip coating and spin coating, show that the three polymers have a smooth surface. These results confirm that the new terpolymer is comparable to PLA in terms of surface properties. Further study is needed using other techniques such as atomic force microscopy (AFM) in order to analyze surface roughness more accurately.

Optical microscopy images of a stent were recorded to observe its surface before and after being coated with the terpolymer. Scanning Electron Microscopy (SEM) or Transmission Electron Microscopy (TEM) images of the stent should also be recorded to get more accurate images with more details.

The second aspect was about the *in vitro* overtime release profile and kinetics of the grafted Paclitaxel in three conditions: 1) incubation in PBS, 2) incubation in PBS with esterase, 3) incubation in PBS with lipase. The cumulative Paclitaxel concentration curves show an increasing linear trend, indicating that the release of Paclitaxel follows a zero order kinetics in all three cases, which is ideal for maintaining a constant concentration of drug in the blood for an extended period of time. In order to confirm these results and obtain further information, it

is necessary to reproduce this experiment under the same conditions, in the co-presence of esterase and lipase enzymes, or using other enzymes, or in human serum.

Finally, the last analyzed aspect was the *in vitro* behavior of HUVEC cells with respect to the aforementioned polymers. The results of LDH cell viability assay show that the toxicity level of PDMMLA-PTX 30/10/60 is slightly higher than PDMMLA 40/60. Nevertheless, it remains close and comparable to that of PLA at 24h and 48h, and becomes even lower at 72h and 96h of culture. On the other hand, the cell spreading study shows that the spreading of HUVECs on PDMMLA-PTX 10/30/60 surface is more pronounced compared to PDMMLA 40/60 and PLA. These findings are positive and encouraging and require further studies to validate the use of PDMMLA-PTX 30/10/60 as a bioactive coating of stents.

While PDMMLA copolymers containing up to 30% -COOH are not soluble in water, PDMMLA 40/60 is soluble in aqueous medium due to the presence of 40% of these groups. This indicates that increasing the hydrophilicity above 30% makes the copolymer water-soluble. After grafting Paclitaxel, the polymer becomes more hydrophobic and insoluble in water, but it shows other disadvantages in terms of mechanical properties.

Indeed, stents and pates are easily covered by PDMMLA-PTX 30/10/60 films and the coating remains on the surface in ambient air without undergoing deformation. However, the terpolymer changes behavior when brought into contact with an aqueous solution, such as PBS (for release studies) or a culture medium (for cell response studies). The polymer film cracks and peels off the plate after a few hours of incubation. As this behavior of the terpolymer is problematic for its use as a stent coating, its mechanical properties need to be improved. The viscoelastic aspect of the polymer requires an in-depth study to understand the origin of this brittleness of PDMMLA-PTX 30/10/60 in aqueous medium. This behavior of the terpolymer and the cracking polymer films caused difficulties in performing the biological experiments, especially for the cell spreading tests. Therefore, it is necessary to find strategies to improve the mechanical properties of the latter.

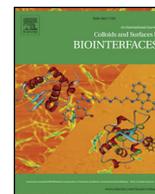
As mentioned above, the copolymer 40/60 exhibits a high level of hydrophilicity to the point of being soluble in an aqueous solution. The first step in optimizing the terpolymer could be through the choice of another support copolymer as the grafting platform for the active drug. For example, the grafting of Paclitaxel can be carried out on the copolymer 30/70 instead of the copolymer 40/60.

Another possibility would be to graft a smaller amount of Paclitaxel (around 5% for example). It would also reduce its release kinetics, given the results of our study, which indicate

that Paclitaxel is not integrally released after 15 weeks of incubation. A lower load of Paclitaxel could probably improve the viscoelastic behavior of the terpolymer and accelerate its release kinetics.

Moreover, the grafting of another active drug like Sirolimus can be carried out and compared to the case of Paclitaxel.

Finally, *In vitro* and *in vivo* biological experiments need to be carried out on the optimized terpolymer to confirm its adequate effects on the organism and the prevention of intra-stent restenosis.



Small changes in PDMMLA structure influence the adsorption behavior of ECM proteins and syndecan-4 on PDMMLA derivative surfaces: Experimental validation by tensiometric surface force measurements

Elnaz Gholizadeh^{a,1}, Rima Belibel^{b,1}, Laurence Mora^c, Didier Letourneur^d, Christel Barbaud^{a,*}

^a Université Sorbonne Paris Nord, Laboratory for Vascular Transitional Science (LVTS), INSERM UMR 1148, F-93430, Villetaneuse, France

^b KymiaNova, F-92290, Châtenay Malabry, France

^c Université Sorbonne Paris Nord, Institut Galilée, F-93430, Villetaneuse, France

^d INSERM UMR 1148, LVTS, Hôpital Bichât, F-75018, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein adhesion
Biopolyesters
In-stent restenosis
Dynamic tensiometry
Syndecan-4
ECM proteins

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death around the world according to the World Health Organization. In-stent restenosis is an inflammatory response of the immune system to endovascular stent implantation in atherosclerotic patients. Biocompatible and biodegradable polymers are of great interest in this field in order to limit the side effects of stent treatments. Poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) is a new biodegradable statistical polyester which presents promising properties as a stent coating. In this work, we studied by dynamic tensiometry, the adhesion of extracellular matrix proteins (bovine serum albumin, fibronectin, fibrinogen, and vitronectin) and plasma membrane proteoglycan (syndecan-4) on three PDMMLA derivatives with different hydrophilicity levels. The results show that proteins have different adhesion profiles and affinity on these surfaces. They show similar behavior on the most hydrophilic surface, making hydrophilic, ionic and hydrogen type bonds. Then we compared each protein's individual profile to that of a mixture of all studied proteins. The comparison shows that vitronectin and syndecan-4 are the quantitatively dominating proteins adsorbed by specific interactions. Based on the results from previous studies, this work allowed us to identify the most important PDMMLA surface as a promising biomaterial for bioactive stent-coating.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are the main cause of mortality and morbidity in the world [1,2]. In stenosis cases, where the arterial lumen narrows because of an atheromatous plaque formation, percutaneous devices (such as cardiovascular stents) and bypass surgery are utilized in order to re-establish a normal blood flow. These interventions cause a disruption of the vessel wall. After a stent implantation, in approximately 20–30 % of the cases (where a bare metal stent (BMS) is used), in-stent restenosis (IR) is observed due to an inflammatory response of the immune system [3,4]. Platelet aggregation, smooth muscle cell (SMC) proliferation and migration, and growth factor release are responsible for the neointimal hyperplasia causing a re-narrowing of the arterial lumen [5,6].

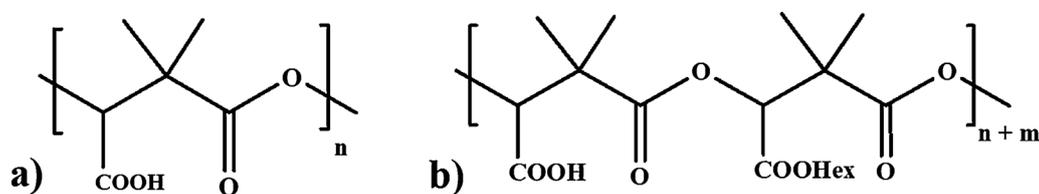
Biocompatible and bioresorbable polymers are used in order to limit the direct contact of the BMS with the blood [7]. A favorable polymer to be used in this case would be a polymer able to inhibit the proliferation

and the migration of SMCs, and promote the vessel re-endothelialization in order to re-vascularize the damaged area. The most used bioresorbable polymers for stent coating are poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polyesters with suitable thermal properties and degradation time [8,9]. We present a new bioactive polyester, which would provide all the needed properties of an adequate stent coating; Poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) (Scheme 1a) is a biocompatible and biodegradable polyester with promising properties. The synthesis of amphiphilic PDMMLA derivatives takes place by incorporating on the polymer side chain, carboxyl groups (–COOH) and hexylic ester groups (–COOH_{hex}), giving the polymers their hydrophilic and hydrophobic characters respectively (Scheme 1b) [10]. This property is a huge advantage compared to PLA and PLGA. Indeed, the degradation kinetics of PDMMLA can be controlled by regulating its hydrophilic/hydrophobic balance [11]. All PDMMLA derivatives studied here have a glass transition temperature (T_g) under 37 °C and show interesting thermomechanical properties

* Corresponding author.

E-mail address: barbaud@univ-paris13.fr (C. Barbaud).

¹ Co-first authorship.



[12]. Also, the presence of chemically alterable functions on PDMMMLA's side chain ($-COOH$) represents a great potential for a covalent grafting of active drugs on the polymer, which cannot be realized on the currently used biopolymers. This allows a well-managed controlled release of drug during the arterial healing process.

Here, we study three PDMMMLA derivatives with different hydrophilic/hydrophobic ratio: 1) PDMMMLAH₁₀-co-Hex₉₀, 2) PDMMMLAH₂₀-co-Hex₈₀, and 3) PDMMMLAH₃₀-co-Hex₇₀ named 10/90, 20/80 and 30/70 respectively.

When a biomedical material is implanted in the body, its surface gets covered by a layer of serum or plasma proteins. The adsorbed proteins can then freely reorient and change conformation, affecting the wettability of the material surface, and its surface force and its environment interaction [13]. Understanding surface-protein interactions is important for the prediction of biological answers (surface/cell); these interactions play a central role in cell mechanism regulation (adhesion, spreading and proliferation...) [14–16]. This surface/cell interaction depends on the physicochemical properties of the polymeric biomaterial surface (such as roughness, wettability and surface charge). Cell attachment is mediated by the adhesion proteins contained in the physiological medium (proteins/cell) [17]. Thus, the ability of materials to adsorb adhesive proteins in a favorable conformation (surface/protein) will determine their ability to induce cell adhesion and spreading (*surface/protein/cell*), a fundamental aspect in the biocompatibility of surfaces (Fig. 1).

The initial adsorption of proteins on a surface occurs very rapidly and avoids direct interactions between cells and the surface [18]. This protein adsorption can be promoted or, on the contrary, inhibited by surface modifications involving the hydration of proteins and surfaces, the redistribution of charges at the proteins interface/conformational changes [19]. The characterization of the adsorption of proteins on different surfaces makes it possible to better understand the physiological phenomena and to guide the cellular response.

DCA is a technique used for the measurement of dynamic wettability changes of a surface allowing to detect the dynamic interfacial and surface configuration changes of a biomaterial [20,21]. DCA method characterizes the surface/interface changes during the protein

adsorption by measuring the surface wetting tension. It also gives information about the proteins conformational changes and the reversibility phenomenon [22]. Palacio and Bhushan present a schematic demonstration of protein and cell adsorption on surfaces with different characteristics [23].

Four ECM proteins (Bovine Serum Albumin (BSA), fibronectin (Fn), fibrinogen (Fb), vitronectin (Vn)) are used to carry out the experiments. Then, a very interesting plasma membrane proteoglycan, syndecan-4 (Syn-4) is studied because of its overexpression during the healing period of a damaged arterial tissue [24]. A mixture of these proteins is also studied in order to compare each protein's individual profile to that of the case where they are all present. This allows to identify the dominating adsorbed protein and its affinity with each polymer surface.

2. Experimental section

2.1. Polymer synthesis and polymer film preparation

Three statistical PDMMMLAs were synthesized through an anionic ring opening polymerization of β -lactone monomers. Two different β -lactones were used in order to obtain the wanted amphiphilic copolymers. (**10/90**: $M_{n(10/90)} = 148060$ g/mol, $M_w(10/90) = 153800$ g/mol, $D_{(10/90)} = 1.038$; **20/80**: $M_{n(20/80)} = 214420$ g/mol, $M_w(20/80) = 231800$ g/mol, $D_{(20/80)} = 1.081$; **30/70**: $M_{n(30/70)} = 354460$ g/mol, $M_w(30/70) = 364800$ g/mol, $D_{(30/70)} = 1.029$) The protocols for the synthesis of the copolymers, β -lactones as well as different characterization techniques are described in the literature [25,26]. The mean surface roughness values (R_a) for each copolymer are: $R_a(10/90) = 0.106$ nm; $R_a(20/80) = 0.184$ nm; $R_a(30/70) = 0.216$ nm [20].

For the preparation of polymer films, glass slides (Objektträger, 10×13.3 mm, 0.99 mm thick, MENZEL-GLASSER, Braunschweig, Germany) were cleaned in water, chloroform, and acetone, then, dried at $37^\circ C$ in an oven. Polymers were dissolved in a small quantity of acetone in order to obtain a viscous solution. The polymers solution was loaded on both sides of the glass slides with a micropipette ($n = 3$ for each experiment). The covered slides were dried at room temperature, then at $37^\circ C$ overnight in order to obtain visible, smooth and

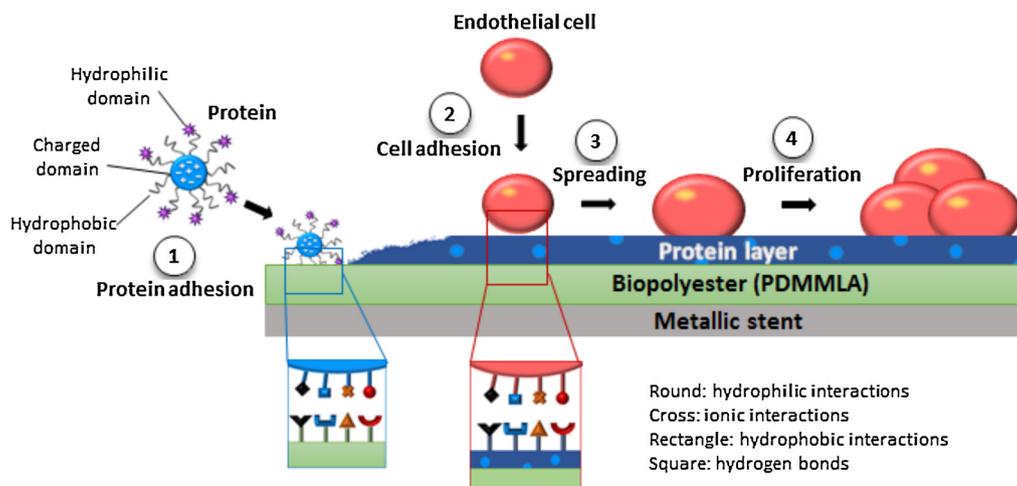


Fig. 1. Schematic presentation of protein layer formation on a biomaterial and cell adhesion on the protein layer.

homogeneous films.

2.2. Protein solution preparation

All proteins (BSA, Fn, Fb, Vn, and Syn-4) were purchased from Sigma Aldrich and employed as received. All protein solutions were prepared in Phosphate Buffered Saline (PBS), pH = 7.4, at 0.2 % of total plasma proteins' concentration, representing the physiological concentration for each protein (BSA at 86 µg/mL, Fb at 6 µg/mL, Fn and Vn at 0.6 µg/mL, and Syn-4 at 1 µg/mL) [21]. The "Mix" solution was prepared in accordance with the physiological proportions, by mixing equal volumes of each previously prepared protein solution.

Bovine Serum Albumin (BSA) is used as a model protein for albumin. It is a globular protein, with a plasma concentration range of 35–50 mg/mL; it is thus the most abundant protein in the plasma. Regulating the oncotic pressure of blood is the main function of this protein [27].

Fibronectin (Fn) is a multi-domain glycoprotein. Fn regulates cell adhesion, migration and differentiation [28] and provides structural support for cell survival, gene expression, growth factor signaling, etc [29]. This protein is soluble in a globular form in the plasma (concentration range of 0,2 to 0,4 mg/mL), and insoluble in a fibrillary pattern in the ECM [30].

Vitronectin (Vn) is a cell adhesion promoting glycoprotein present in the ECM with a concentration range of 0.25 to 0.45 mg/mL. Although it has a similar activity to Fn in terms of cell attachment and spreading it remains biochemically and immunologically different from the latter [31,32].

Fibrinogen (Fb) is a glycoprotein that cleaved with fibrin, plays an important role in the process of hemostasis and coagulation, which is essential in limiting blood loss and wound healing. It is present in the plasma with a concentration range of 1.5–4.5 mg/mL [33].

It is also known that Fb and its breakdown products promote processes like angiogenesis, migration and proliferation of various cells such as fibroblasts, smooth muscle cells (SMCs) and lymphocytes, which are important events in tissue repairing [34].

Syndecan-4 (Syn-4): Syndecans are transmembrane heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) synthesized by many cells. Syndecans bind extracellular ligands via their covalently attached heparan sulfate chains and influence intracellular events through transmembrane signaling pathways [35]. There are four syndecan family members: syn-1, syn -2, syn -3, and syn -4 [36]. Here, we study Syn-4 thanks to its major role in biological functions such as regulation of blood coagulation, cell adhesion, and cell growth [37]. Studies show that Syn-4 activates flow-dependent atheroprotective pathways by sensing flow direction and promoting endothelial cell alignment [38]. Its presence is also essential in neointimal formation and preventing cardiac rupture after vascular injuries [39,40]. Studies show that in patients with myocardial infarction (MI), human Syn-4 expression is elevated following MI in repair region of the damaged cardiac tissue [41]. Our biology research team demonstrated that Syn-4 is positively involved in this process of arterial healing [42].

2.3. Dynamic protein adsorption by DCA

Surface wetting forces of PDMMLA derivatives (10/90, 20/80, and 30/70) were registered in the presence of different proteins in order to study their interaction with different polymer surfaces. The experiments were carried out using a Wilhelmy balance tensiometer (K100MK2 from Krüss GmbH), connected to a computer for sorption and contact angle measurement and analysis. The relation between surface tension and force is established by the Wilhelmy method using the following equation:

$$F = \gamma_{lv} \cdot L \cdot \cos\theta$$

where F is the force in mN, γ_{lv} the surface tension of the liquid, L the wetted length, and θ either the advancing or the receding contact angle [22]. The contact angle hysteresis is determined by calculating the difference between the advancing and receding contact angles. Surface chemistry, morphology and roughness are the main factors affecting thermodynamic hysteresis [14].

To perform the blank experiment, 10 wetting/dewetting cycles of the polymer films were realized in a PBS solution (pH = 7.4). To perform the protein experiments 5 cycles were realized for adsorption (5 wetting/dewetting of the polymer film in the protein solution), followed by 5 cycles for desorption/rinsing (5 wetting/dewetting of the same polymer film in PBS). For all samples, immersion depth and the immersion/emersion rate were set to 10 mm and 6 mm/min respectively. All experiments were carried out at 37 °C.

3. Results and discussions

Three statistical PDMMLA surfaces (10/90, 20/80 and 30/70) were studied in contact with five proteins (BSA, Fn, Fb, Vn and Syn-4). Three kinds of interaction forces were considered in this study: ionic interactions, hydrogen bond and hydrophobic interactions (Fig. 1). Ionic and hydrogen bond interactions are dominant in carboxyl groups, while hydrophobic interactions are dominant in the hexylic ester groups of the polymers side chains.

In a parallel work, *in vitro* cell adhesion, spreading and proliferation are performed in order to evaluate the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) behavior on different polymer-based films (10/90, 20/80 and 30/70). First results are very encouraging (results will shortly be published). In order to complete this work and explain the obtained results, we study in this work, the protein adhesion on these PDMMLA surfaces using DCA technique with the intention of designating the future bioactive stent coating.

In this work, we are interested in the advancing wetting force, "F" of PDMMLA derivatives in the presence of different proteins, as well as a mixture of all these studied proteins.

3.1. Blank experiments

10 cycles of wetting/dewetting in PBS (no proteins) were realized on copolymers 10/90, 20/80, and 30/70. The measured advancing wetting force values for each polymer are represented as a function of cycle numbers (Fig. 2). The increase of a wetting force indicates the increase of hydrophilic character of the surface.

Blank experiments show that F increases with the increase of carboxyl groups on the polymer chain. Copolymers 10/90 and 20/80 reveal a baseline between 3 and 4 mN (3.18 ± 0.07 mN and 3.38 ± 0.04 mN respectively). F values are slightly higher for

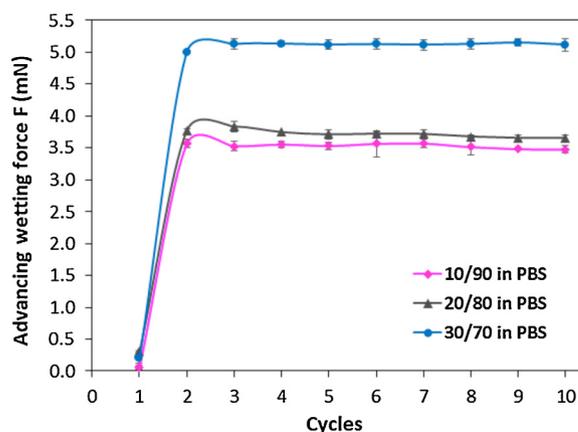


Fig. 2. Blank experiments of copolymers 10/90, 20/80, and 30/70 in PBS at 37 °C (n = 3).

copolymer 20/80 due to the existence of 20 % of hydrophilic groups versus 10 % in 10/90 ($p > 0.05$). This non-significant increase of F confirms the increase of the hydrophilicity of the surface but is not sufficient to make a considerable difference between these two surfaces.

It can be explained that in the case of copolymer 10/90, due to the presence of 90 % of hexylic ester groups, the carboxyl functions are hidden and less exposed by self-organization of these hydrophobic side chains.

In contrast, a significant gap is observed between copolymers 20/80 and 30/70 (4.62 ± 0.07 mN) ($p < 0.05$). This indicates that with 30 % of carboxyl functions, the polymer has more opportunities to expose these groups to the interface between the polymer surface and aqueous medium. These chains are further exposed to the surface compared to previous cases. Indeed, the percentage of hydrophilic chains has a significant impact on the chain mobility effect.

3.2. Protein adsorption/desorption

The first 5 cycles of wetting/dewetting are realized in a protein solution (cycles 1–5 for adsorption experiment) and the last 5 cycles are realized in a PBS solution (cycles 6–10 for rinsing/desorption experiment). Each profile is compared to that of PBS alone obtained with corresponding polymer film. If the adsorption curve is superimposed with the baseline (PBS curve), there is no adhesion. Above the baseline, the protein is adsorbed via hydrophobic interactions, exposing its hydrophilic parts to the surface. If the curve is below the baseline, adsorption takes place via hydrophilic interactions, exposing hydrophobic parts of the protein to the surface. As for the rinsing stage, three cases can be observed: if the rinsing curve is on the baseline, it means that either the protein is desorbed ($\Delta F = 0$), or reoriented ($\Delta F \neq 0$). If the force remains stable with no change, it means that the protein is adsorbed without reorientation or desorption. If the force changes (increase or decrease), it means that the protein is adsorbed and changes conformation/orientation.

In all studied cases, a very low value of F is observed for the first immersion cycle (cycle 1 for adsorption and cycle 6 for rinsing). This first cycle determines the surface pressure. The surface pressure decreases with increasing of interfacial tension during the first contact (polymer-air-solution interfacial tension). The stabilizing cycles are then established and form a polymer-solution contact from the second immersion cycle (cycle 2 for adsorption and cycle 7 for rinsing).

Fig. 3 shows the BSA adsorption/desorption profiles on three polymer surfaces. BSA is strongly adhered to the 10/90 surface via hydrophobic interactions at the first contact with the polymer. The surface becomes slightly more hydrophilic during rinsing ($\Delta F = 0.46 \pm 0.005$ mN). Adsorbed BSA changes conformation during rinsing, it decreases the hydrophobic interaction but leaves the electrostatic interaction. The surface becomes less hydrophilic compared to adsorption case ($\Delta F = 0.15 \pm 0.01$ mN). This is confirmed by the case of 20/80 copolymer containing more hydrophilic groups. The adhesion of BSA takes place by more hydrophilic interactions compared to 10/90, but its

adhesion does not change the surface hydrophilicity. The adsorption/desorption interfacial force is very close to that of PBS alone ($\Delta F = 0.03 \pm 0.07$ and -0.05 ± 0.08 mN, respectively). Regarding the 30/70, the surface is suitable for making hydrophilic interactions as well as hydrogen bonds and ionic interactions. All adhered BSA remains attached to the surface, and does not change conformation during the rinsing step ($\Delta F = -3.67 \pm 0.02$ (adsorption) and -3.81 ± 0.01 mN (rinsing)).

In conclusion, BSA adsorption power increases as hydrophilic character increases, which means that the BSA affinity is reduced by hydrophobic interactions.

The results of the tests on the other studied proteins are represented in the Fig. 4.

According to the experimental results, it is clearly visible that from the copolymer 10/90 (the most hydrophobic surface) to the copolymer 30/70 (the most hydrophilic surface), the surfaces become more and more hydrophobic after the adhesion of different proteins (Table 1 and Fig. 5). Only the copolymer 30/70 has the surface on which all proteins expose their hydrophobic side after adhesion, meaning that increasing the hydrophilicity of the polymer surface promotes hydrophilic, ionic interactions and hydrogen bond type adhesions. Concerning V_n , which presents a hydrophobic curve for all three surfaces 10/90, 20/80 and 30/70 ($\Delta F = -2.40 \pm 0.02$, -2.69 ± 0.02 and -4.17 ± 0.01 mN, respectively), we can say that the latter makes only one type of interaction on all surfaces. Syn-4, which is not a plasma protein, shows a similar behavior on all three copolymers with small difference of F values ($\Delta F = -2.87 \pm 0.04$, -3.09 ± 0.04 and -3.76 ± 0.002 mN, respectively).

In addition, using the whole set of studied polymers and proteins, we can see the overall trend between interfacial force and acidity percentage (%A) of polymers. Fig. 5 histograms show the variations of proteins profiles on different polymer surfaces during adsorption/desorption cycles and linear correlation of F with %A. The slope corresponds to the sensitivity of the correlation and R^2 is the correlation coefficient. R^2 and slope are calculated for the interfacial force F (the straight line is drawn only from the three points corresponding to the three studied copolymers).

With the exception of membrane protein Syn-4 which gives the same profile as blank (increase of F with the increase of acidity), the hydrophobicity of surface increases linearly with %A (decrease of F) for all studied plasma proteins. Indeed, V_n exhibits the highest sensitivity associated to an excellent R^2 correlation coefficient which is very close to 1 for adsorption ($R^2 = 0.97$) and equal to 1 for desorption. BSA and Fn are also interesting ($R^2 = 0.81$ and 0.87 , respectively) whereas Mix is not well fitting to %A (R^2 far from 1). R^2 of Fb and Syn-4 are close to 0.80.

Then, the “Mix” curve represents the overall behavior of the mixture of all studied proteins, giving information about affinity to the surface and competitiveness between the proteins. As observed with plasma proteins, from the most hydrophobic polymer (10/90) to the most hydrophilic one (30/70), surfaces become more hydrophobic after the

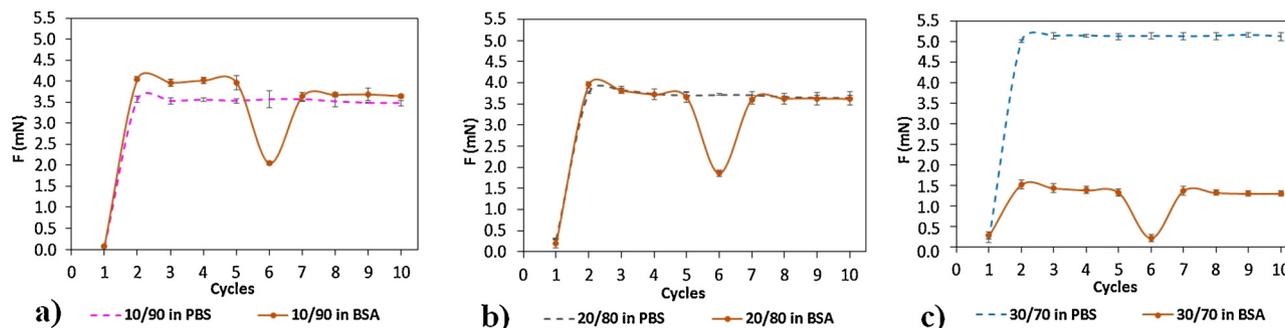


Fig. 3. Adsorption and desorption of BSA on a) 10/90, b) 20/80, c) 30/70 copolymer surfaces ($n = 3$).

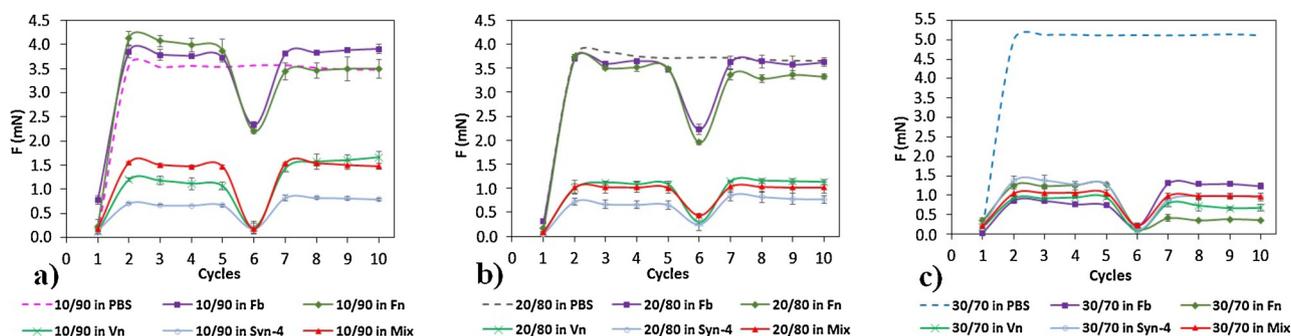


Fig. 4. Comparative behavior of different proteins on a) 10/90, b) 20/80, c) 30/70 copolymer surfaces (n = 3).

Table 1

Hydrophilicity of copolymer surfaces compared to the baseline (PBS alone) after protein adhesion. ΔF is the difference between F of adsorption/desorption and F of blank.

	ΔF (mN) 10/90		ΔF (mN) 20/80		ΔF (mN) 30/70	
	Adsorption	Rinsing	Adsorption	Rinsing	Adsorption	Rinsing
BSA	++ (0.46 ± 0.005)	+	0 (0.03 ± 0.07)	0 (-0.05 ± 0.09)	----	----
Fn	++ (0.47 ± 0.09)	0 (-0.03 ± 0.13)	- (-0.20 ± 0.02)	- (-0.34 ± 0.04)	----	----
Fb	+ 0.01)	+ (0.35 ± 0.02)	+ (-0.16 ± 0.04)	0 (-0.06 ± 0.08)	----	----
Vn	---	--	---	---	----	----
Syn-4	(-2.40 ± 0.02)	(-1.94 ± 0.06)	(-2.70 ± 0.02)	(-2.53 ± 0.001)	(-4.17 ± 0.01)	(-4.41 ± 0.01)
Mix	(-2.87 ± 0.04)	(-2.70 ± 0.03)	(-3.09 ± 0.04)	(-2.87 ± 0.06)	(-3.76 ± 0.001)	(-4.17 ± 0.02)
	(-2.04 ± 0.03)	(-1.99 ± 0.01)	(-2.75 ± 0.06)	(-2.65 ± 0.07)	(-4.04 ± 0.01)	(-4.15 ± 0.01)

adhesion of different proteins (Mix) (Table 1 and Fig. 5).

In the case of the copolymers 10/90 and 20/80, the closest curve to that of the “Mix”, is the Vn’s, meaning that this protein has an important affinity to these surfaces. It adheres the first when all the studied proteins are present in the medium, making the surface more hydrophobic. Regarding the copolymer 30/70 though, we can see that all of the curves are gathered around the “Mix” curve. This means that in the presence of all of the studied proteins, the surface becomes hydrophobic and all of the proteins show a similar affinity to the surface with poor competitiveness even though the domination of Vn is visible.

The mobility of the carboxyl groups on the 30/70 copolymer surface results in exposing these groups further to the surface, leading to further possible hydrophilic interactions between the surface and the proteins. Furthermore, at neutral pH these groups exist in both carboxyl ($-\text{COOH}$) and carboxylate anion ($-\text{COO}^-$) forms, which favor also the formation of ionic and hydrogen bonds. The adhered proteins thus expose their hydrophobic parts to the surface and reduce the hydrophilicity.

4. Conclusion

DCA technique was used to measure surface forces between three PDMMMLA derivatives (10/90, 20/80, and 30/70) in contact with different protein solutions, allowing to determine different protein adhesion profiles on each of these surfaces. Studying protein adhesion on biomaterial surfaces is important because of its considerable role in inducing cell adhesion on these surfaces.

This work shows that there is a strong correlation between the surface hydrophilicity and protein adhesion on the studied copolymers.

The “Mix” experiment is realized in order to obtain data about the affinity and competitiveness between the different proteins. In the case

of copolymer 30/70, all proteins show similar adhesion profiles with low competitiveness. All studied proteins are adhered to the surface via hydrogen bonds, hydrophilic and ionic interactions making the polymer surface more hydrophobic than the starting point.

Vn gives a hydrophobic sorption curve for all three surfaces, meaning that the latter makes only one type of interaction with all surfaces.

Syn-4, a transmembrane plasma protein, shows also similar behavior on all studied surfaces.

First results of parallel work show that the HUVECs are more likely to adhere on more hydrophobic surfaces (i.e. copolymer 10/90) than hydrophilic ones. However, the spreading and growth of these cells might demand a moderately hydrophilic surface (i.e. copolymer 30/70) (results will shortly be published). On the other hand, study shows that even on hydrophobic surfaces, there is a chance for the endothelial cells to grow constantly in a time-dependent manner [13]. Therefore, to validate the choice of the customized polymer 30/70, further study is needed to determine cell attachment, spreading, proliferation and growth on the surfaces covered by the protein layer, in the presence and absence of growth factors and other parameters affecting cell growth. These experiments will shortly be carried out and the results will be communicated in a next publication.

CRedit authorship contribution statement

Elnaz Gholizadeh: Methodology, Writing - original draft, Resources, Investigation. **Rima Belibel:** Methodology, Writing - original draft. **Laurence Mora:** Methodology. **Didier Letourneur:** Supervision. **Christel Barbaud:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, Supervision, Project administration.

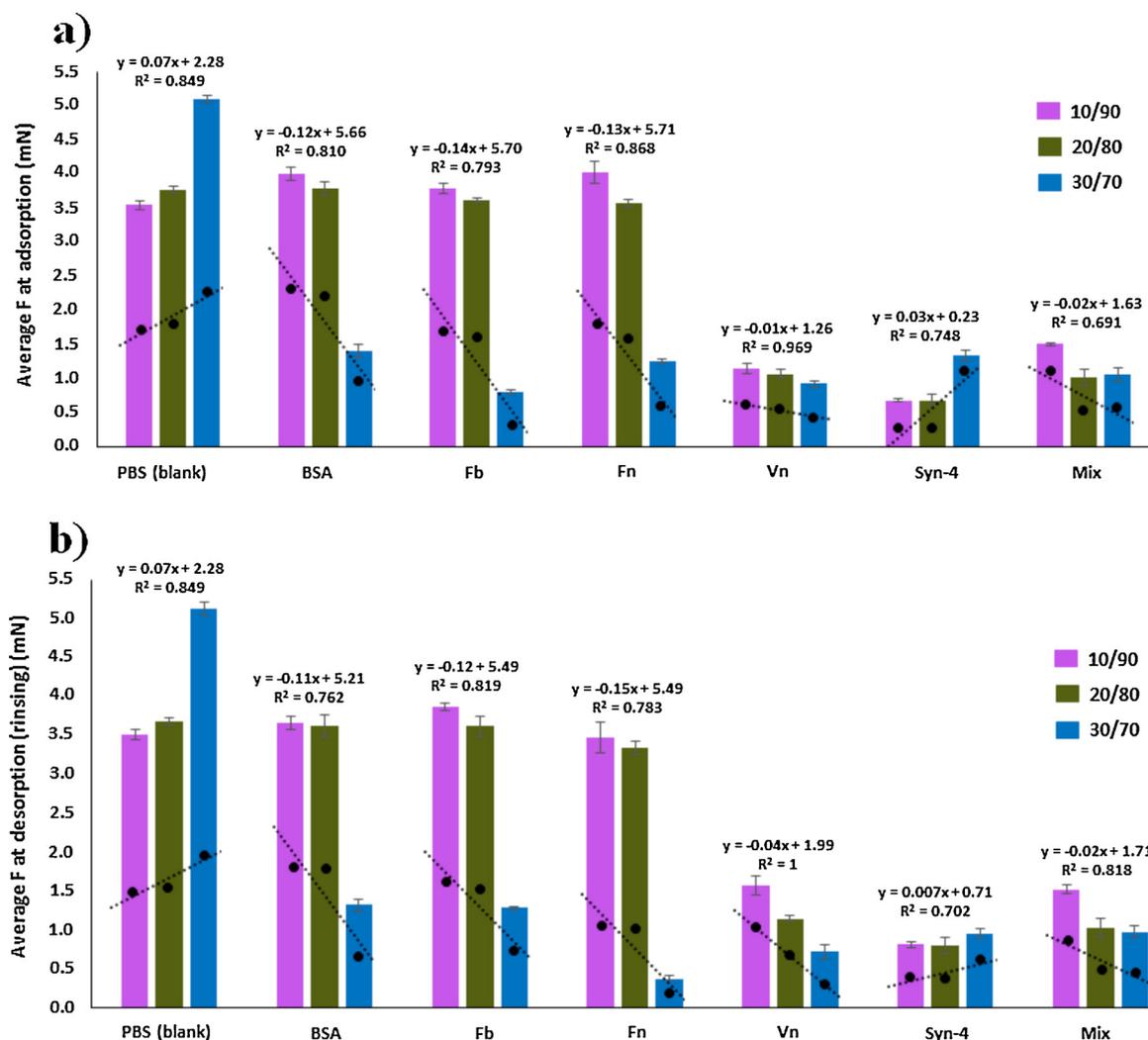


Fig. 5. :Protein profile variations on different polymer surfaces during a) adsorption, b) desorption (rinsing), and linear correlation of F with %A.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] A. Strohbach, R. Busch, Polymers for cardiovascular stent coatings, *Int. J. Polym. Sci.* 2015 (2015).
- [2] D. Versari, L.O. Lerman, A. Lerman, The importance of reendothelialization after arterial injury, *Curr. Pharm. Des.* 13 (17) (2007) 1811–1824.
- [3] M.S. Kim, L.S. Dean, In-stent restenosis, *Cardiovasc. Ther.* 29 (3) (2011) 190–198.
- [4] R.A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati, Stent thrombosis and restenosis: what have we learned and where are we going? The Andreas Gruntzig Lecture ESC 2014, *Eur. Hear. J* (2015).
- [5] S.O. Marx, H. Totary-Jain, A.R. Marks, Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis, *Circ. Cardiovasc. Interv.* (2011).
- [6] R. Hoffmann, et al., Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular ultrasound study, *Circulation* 94 (6) (1996) 1247–1254.
- [7] M.N. Babapulle, M.J. Eisenberg, Coated stents for the prevention of restenosis: Part II, *Circulation* 106 (22) (2002) 2859–2866.
- [8] R.K. Kulkarni, E.G. Moore, A.F. Hegyeli, F. Leonard, Biodegradable poly(lactic acid) polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* (1971).
- [9] U. Westedt, et al., Paclitaxel releasing films consisting of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) and their potential as biodegradable stent coatings, *J. Control. Release* (2006).
- [10] F. Ouhib, S. Randriamahafa, P. Guerin, C. Barbaud, Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β -trisubstituted β -lactones and their characterizations, *Des. Monomers Polym.* 8 (1) (2005) 25–35.
- [11] R. Belibel, N. Marival, H. Hlawaty, C. Barbaud, Poly((R,S)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells, *Polym. Degrad. Stab.* 130 (2016) 288–299.
- [12] R. Belibel, I. Azzouz, C. Barbaud, Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((S)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 54 (11) (2016) 1495–1507.
- [13] T.G. Ruardy, H.E. Moorlag, J.M. Schakenraad, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, Growth of fibroblasts and endothelial cells on wettability gradient surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* (1997).
- [14] C.M. Alves, R.L. Reis, J.A. Hunt, The dynamics, kinetics and reversibility of protein adsorption on the surface of biodegradable materials, *Soft Matter* (2010).
- [15] F. Rupp, D. Axmann, C. Ziegler, J. Geis-Gerstorfer, Adsorption/desorption phenomena on pure and Teflon® AF-coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis, *J. Biomed. Mater. Res.* (2002).
- [16] C. Müller, et al., Protein adhesion on dental surfaces- a combined surface analytical approach, *Anal. Bioanal. Chem.* (2011).
- [17] H.T. Aiyelabegan, E. Sadroddini, Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials, *Biomed. Pharmacother.* (2017).
- [18] Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer, Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials, *Materials* (2015).
- [19] R.A. Hartvig, M. Van De Weert, J. Østergaard, L. Jørgensen, H. Jensen, Protein adsorption at charged surfaces: the role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation, *Langmuir* (2011).
- [20] R. Belibel, T. Avramoglou, A. Garcia, C. Barbaud, L. Mora, Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: a static contact angle analysis of polyester model films, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 998–1006.
- [21] S. Benni, T. Avramoglou, H. Hlawaty, L. Mora, Dynamic contact angle analysis of protein adsorption on polysaccharide multilayer's films for biomaterial re-endothelialization, *Biomed. Res. Int.* (2014).
- [22] Y. Yuan, T.R. Lee, Contact angle and wetting properties, *Springer Ser. Surf. Sci.* (2013).
- [23] M.L.B. Palacio, B. Bhushan, Research article: bioadhesion: a review of concepts and

- applications, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (1967) (2012) 2321–2347.
- [24] T. Kojima, et al., Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction, *Thromb. Haemost.* (2001).
- [25] R. Belibel, C. Barbaud, Synthesis of New Optically Active α , α' , β -Trisubstituted β -Lactones As Monomers for Stereoregular Biopolyesters, (2015), pp. 2586–2597.
- [26] C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahafa, P. Guérin, Synthesis of new homopolyester and copolyesters by anionic ring-opening polymerization of α, α', β -trisubstituted β -Lactones, *Macromol. Chem. Phys.* 205 (2) (2004) 199–207.
- [27] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology* (2005).
- [28] J.E. Schwarzbauer, D.W. DeSimone, Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2011).
- [29] J.A. Faralli, M.K. Schwinn, J.M. Gonzalez, M.S. Filla, D.M. Peters, Functional properties of fibronectin in the trabecular meshwork, *Exp. Eye Res.* (2009).
- [30] J. Guan, J. Trevithick, R. Hynes, Fibronectin / integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein, *Cell Regul.* (1991).
- [31] J. Li, et al., Impact of vitronectin concentration and surface properties on the stable propagation of human embryonic stem cells, *Biointerphases* (2010).
- [32] K.T. Preissner, Structure and biological role of vitronectin, *Annu. Rev. Cell Biol.* (1991).
- [33] S. Herrick, O. Blanc-Brude, A. Gray, G. Laurent, Fibrinogen, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1999).
- [34] J. Koo, et al., Control of anti-thrombogenic properties: surface-induced self-assembly of fibrinogen fibers, *Biomacromolecules* (2012).
- [35] D.J. Carey, Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors, *Biochem. J.* 327 (Pt 1) (1997) 1–16.
- [36] C.W. Kim, O.A. Goldberger, R.L. Gallo, M. Bernfield, Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns, *Mol. Biol. Cell* (1994).
- [37] J.R. Couchman, A. Woods, Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion, *J. Cell. Sci.* (1999).
- [38] N. Baeyens, et al., Syndecan 4 is required for endothelial alignment in flow and atheroprotective signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014).
- [39] Y. Matsui, et al., Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction, *Circ. Res.* (2011).
- [40] M. Ikesue, et al., Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2011).
- [41] F. Echtermeyer, et al., Syndecan-4 signalling inhibits apoptosis and controls NFAT activity during myocardial damage and remodelling, *Cardiovasc. Res.* (2011).
- [42] L. Maillard, et al., RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway, *Biol. Open* (2014).


 Cite this: *RSC Adv.*, 2020, 10, 32602

Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications

 Elnaz Gholizadeh,^{†a} Rima Belibel,^{†b} Thomas Bachelart,^a Chérifa Bounadji^a and Christel Barbaud ^{*a}

Racemic α,α,β -trisubstituted β -lactones are the monomer units of poly(*(R,S)*-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) derivatives, new biopolyesters showing great potential for biomedical applications. Using different groups during the synthesis of these β -lactones allows a tailored synthesis of PDMMLA copolymers with adjustable hydrophilic/phobic ratio. The degradation kinetics of the employed material is one of the most important criteria in the development of bioresorbable implants. The degradation time of PDMMLA derivatives can be controlled using different β -lactones of different hydrophilicity levels during the polymerization stage. Furthermore, PDMMLA has chemically available groups on its side chain allowing to graft functional groups on the polymer *via* covalent bonds. In this work, following a Steglich esterification protocol, the chemical grafting of cholesterol was carried out on a PDMMLA monomer derived β -lactone as well as on homopolymer PDMMLA-H, and copolymer PDMMLAH_{40-co}-Hex₆₀ (PDMMLA 40/60). Nuclear magnetic resonance (NMR) analyses of the products confirm and quantify the grafting ratio. 100% of cholesterol grafting has been realized on the homopolymer PDMMLA-H giving PDMMLA-Chol, and 10% on the copolymer PDMMLA 40/60, giving PDMMLAH_{30-ter}-Chol_{10-ter}-Hex₆₀ (PDMMLA-Chol 30/10/60) as wished. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra, elemental analysis on the β -lactones and thermogravimetric analyses on the polymers also confirm the chemical modification of the products.

 Received 10th July 2020
 Accepted 23rd August 2020

DOI: 10.1039/d0ra06033j

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Racemic α,α,β -trisubstituted β -lactones are synthetic molecules (Scheme 1), serving as monomers in the synthesis of biodegradable polyesters: poly(*(R,S)*-3,3-dimethylmalic acid) PDMMLA derivatives. These are new statistical biopolyesters, studied for their interesting properties to serve in medical treatments. The main aim in studying PDMMLA derivatives is to develop a polymer for cardiovascular metallic stent coating. Previous works proved the great potential of these polymers for this application in terms of mechanical properties,^{1,2} degradation kinetics,³ and cell response.⁴

PDMMLA derivatives are synthesized through an anionic ring opening polymerization (ROP) of the β -lactones⁵ (Scheme 2). The use of different groups in the synthesis of the monomers, gives different hydrophilicity levels to the synthesized

polymers. The increase in benzylic β -lactone [1] (the benzylic group is hydrolyzed into a carboxylic acid later) increases the hydrophilicity of the final polymer, which changes its degradation kinetics. The ability to control the degradation time of this biopolymer is an advantage compared to currently used biopolymers.⁶

Previous work has shown that the degradation products of PDMMLA are non-toxic and bio-assimilable.³ In addition, the presence of available carboxylic acid groups on the side chain of PDMMLA makes the covalent grafting of active drugs possible, which is promising regarding the controlled release of the drug in order to limit an intra-stent restenosis after implantation.

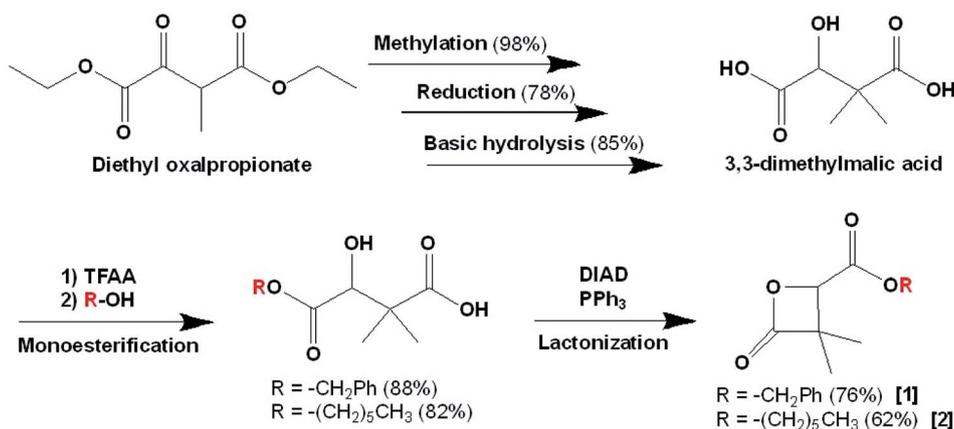
In order to prove the possibility and efficacy of the chemical grafting, we first started with the grafting of cholesterol (Chol) on 4-carboxyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (acidic β -lactone) [3], synthesized here for the first time with the catalytic hydrogenolysis of the benzylic β -lactone [1]. We realized the grafting reaction following the Steglich esterification protocol. Cholesterol is not an active drug, but a model molecule used in this work, only to prove the feasibility of the grafting. Its simple structure compared to that of real drugs allows easier analysis of the obtained data. Furthermore, cholesterol possesses only one

^aUniversité Sorbonne Paris Nord, Laboratory for Vascular Transitional Science (LVTS), INSERM UMR 1148, Villetaneuse, F-93430, France. E-mail: barbaud@sorbonne-paris-nord.fr; Tel: +33 149403357

^bKymiaNova, Châtenay Malabry, F-92290, France

[†] Co-first authorship.





Scheme 1 Synthetic pathway of the α,α,β -lactones: 4-benzyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzylic β -lactone) **[1]** 4-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (hexylic β -lactone) **[2]**.

hydroxyl group, which makes evident that the reaction will take place involving this very group^{7,8} to give 4-cholesteryloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (cholesterolic β -lactone) **[4]** (Scheme 3).

Steglich esterification is used to form an ester bond between a carboxylic acid and a hydroxyl (alcohol) group. *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) activates the carboxyl group, forming an *O*-acylisourea intermediate.⁹ The esterification of the carboxylic acid is improved by addition of a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (DMAP), which leads to a more effective reaction.^{10,11} In our case, the esterification takes place involving the carboxylic acid group of the monomer and/or the polymer and the available hydroxyl group of cholesterol.

Following the same protocol, we realized the grafting on PDMMLA polymers. In order to determine the maximal grafting percentage, the reaction has been carried out on the 100% hydrophilic homopolymer, PDMMLA-H (PDMMLA 100/0); then, on the 40% hydrophilic copolymer, PDMMLA_{40-co-Hex}₆₀ (PDMMLA 40/60) in order to obtain the theoretical terpolymer PDMMLA_{30-ter-Chol}_{10-ter-Hex}₆₀ (PDMMLA 10/30/60).

A study on the degradation kinetics of a series of PDMMLA derivatives showed that the copolymer with 30% of hydrophilic groups (PDMMLA 30/70) has the fastest degradation kinetics in a 6 months' time interval.³ In order to accelerate this process,

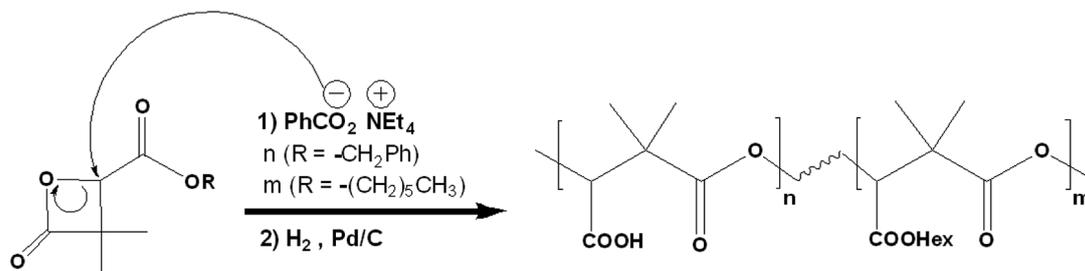
we synthesized a more hydrophilic copolymer, PDMMLA 40/60, which degrades even faster in order to prevent the post-implantation complications due to the presence of the polymer. On the other hand, our team has proved a good cell behavior on the PDMMLA 30/70.⁴ By grafting 10% of an active agent, we aim to conserve 30% of hydrophilicity as in the case of PDMMLA 30/70, and accelerate the degradation of the remaining polymer after the complete release of the active agent.

¹H NMR technique was used to confirm the reaction and the grafting ratio. FT-IR spectra, elemental analysis on the β -lactones and thermogravimetric analyses on the polymers also confirm the chemical modification of the products.

Results and discussion

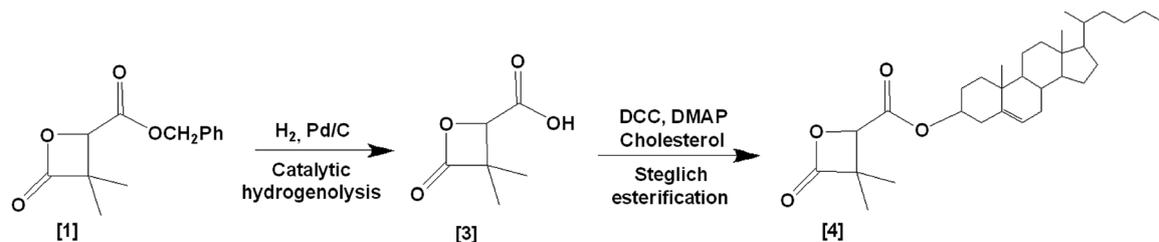
Chemical grafting of cholesterol on the β -lactone and PDMMLAs was carried out *via* Steglich esterification. ¹H analysis of the products confirms the reaction *via* the modification of chemical shifts of the significant groups. Fig. 1 shows the ¹H NMR spectra of cholesterol, acidic β -lactone **[3]**, and cholesterolic β -lactone **[4]**.

Signals at 3.55 ppm (Fig. 1a) and 4.67 ppm (Fig. 1b) correspond to indicated protons on cholesterol and the β -lactone **[3]**. Changes in chemical shifts of these groups integrating for 1H



Scheme 2 Synthesis of PDMMLA polymers through a ROP of the β -lactones. The final copolymer contains carboxylic acid groups ($-\text{COOH}$) and hexylic ester groups ($-\text{COOHex}$).





Scheme 3 Synthesis of acidic β-lactone [3], and cholesterolic β-lactone [4].

each show that a chemical modification has taken place between these molecules with 100% conversion efficiency (Fig. 1c).

Regarding the polymers, chemical shift changes are different from the monomer despite similar electronic effects. This can be explained by the difference in mobility of the molecules. Indeed, the polymer chain is more flexible and mobile than the planar and rigid structure of the β-lactone. In the case of polymers, integral values of the peaks allow to calculate the grafting percentage.

For PDMMLA-Chol, one can observe 100% of cholesterol grafting since the integral values for the peaks at 3.40 ppm (H₃ on cholesterol) and 5.23 ppm (H_b on the polymer) are 1.04 and 1.05 respectively. Regarding the terpolymer, calculations using the integral values of the peaks at 3.45 ppm (H₃ integrating for 0.09H) and 5.28 ppm (H_b and H₆ integrating for 1.11H), give 10% of grafted cholesterol as wanted.

FT-IR analysis of the products before and after cholesterol grafting confirm also the esterification. With the β-lactone for example, the -OH stretching band of cholesterol at 3450 cm⁻¹ disappears completely when grafted, indicating that the hydroxyl group was transformed to an ester. Furthermore, the absorption occurring at 1222 cm⁻¹ corresponds to the C-O stretching of the new ester bond (Fig. 2). Similar results were observed with the polymers, confirming the esterification in all cases.

Elemental analysis of a molecule gives information about its chemical composition. Calculating the molar percentage of each present element in the molecule allows to confirm the

expected composition of the sample. Indeed, experimental values obtained in the case of new cholesterolic β-lactone give coherent results with calculated theoretical values ($C_{th} = 76.90\%$, $C_{exp} = 76/32\%$ and $H_{th} = 10.21\%$, $H_{exp} = 10.43\%$), showing that the expected composition is obtained and the esterification has taken place successfully.

TGA measurements of a polymer give information about the thermal stability of the polymer and its degradation temperature T_d .¹² From the determined values of T_d , we can thus define the maximum temperature lower than the T_d to carry out the DSC analysis of the copolymers without degrading them. DSC technique provides information about the thermal properties of a polymer, mainly the glass transition temperature T_g which shows structural changes in the backbone and melting temperature T_m .^{13,14} Fig. 3 and 4 show the TGA and DSC thermograms of the grafted polymers respectively. Table 1 gathers the values obtained by TGA and DSC measurements.

Grafting cholesterol on the acidic β-lactone has increased its T_m from 48 to 160 °C. Regarding the polymers, they all show a T_d above 150 °C. High T_d value facilitates manipulation under heating conditions if necessary, without thermal degradation of the polymer. The increase of T_g in all cases indicates an addition of rigidity to the structure of the polymers. A significant increase is observed for the homopolymer (from 69.9 to 106.6 °C) since there is 100% of grafting. As for the terpolymer, the T_g increase is slight and less important (from 23.7 °C to 25.7 °C) since there is only 10% of grafted cholesterol.

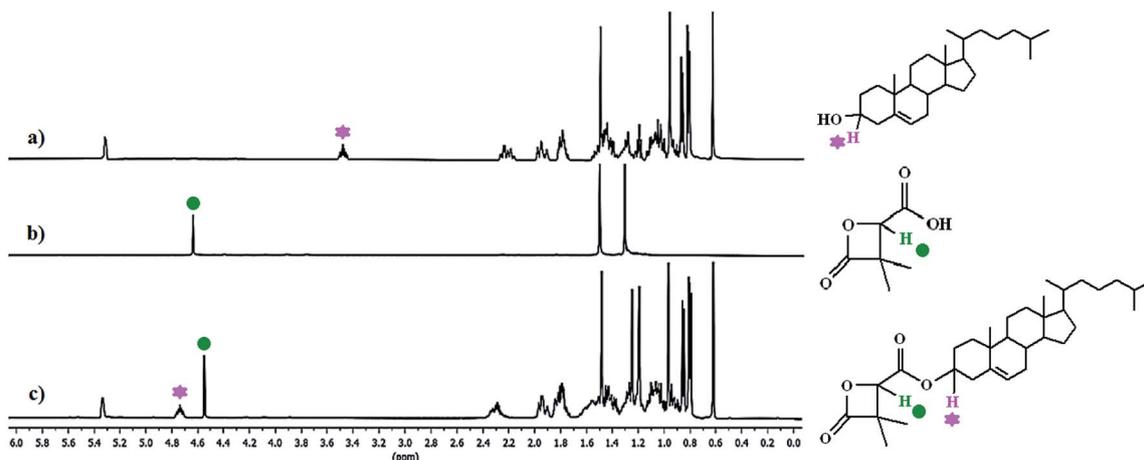


Fig. 1 ¹H NMR spectra of: (a) cholesterol, (b) acidic β-lactone [3], (c) cholesterolic β-lactone [4] in CDCl₃, 400 MHz.



Experimental

Materials and methods

Cholesterol was purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. All other chemicals were purchased from Alfa Aesar chemical Co and employed as received.

Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available reagent-grade solvents were employed without purification. All reactions with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. All glass apparatuses were kept one night in a drying-oven at 100 °C.

Thin Layer Chromatography (TLC) was performed using plates coated with Merck silica gel 60 F₂₅₄ of 0.25 mm thickness. The TLC plates were first revealed under UV light (254 nm wavelength) then with *p*-anisaldehyde stain containing absolute ethanol (93 mL), *p*-anisaldehyde (2.5 mL), concentrated sulfuric acid (3.5 mL) and concentrated acetic acid (1 mL). Flash chromatography (FC) was carried out using silica gel (C–C 35–70 μm, 60 Å).

Nuclear magnetic resonance: ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded by a BRUKER AM-400 MHz spectrometer, using CDCl₃ as solvent. Chemical shifts (δ) are given in ppm.

Infrared: FT-IR spectra were recorded on AVATAR 370 FT-IR Thermo Nicolet OMNI-sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Absorption bands are given in cm⁻¹.

Melting point of the solid compound was determined using a Stuart SMP11 melting point apparatus.

Thermogravimetric analysis (TGA) measurements of the polymers were registered using a TGA Q50 analyzer. Samples were heated from 10 °C to 500 °C with a heating rate of 10 °C min⁻¹ under N₂ atmosphere.

Glass transition temperature (*T*_g) of the samples was measured using differential scanning calorimetry (DSC) technique on a DSC Q2000 analyzer. Polymers were put in the furnace and heated from –25 °C to 160 °C (the maximal temperature was adjusted for each sample according to the *T*_d value obtained from the TGA experiment in the aim to avoid degrading the copolymer during the first run), cooled down to –25 °C, and reheated in order to realize the

second heating cycle. The heating rate was set to 10 °C min⁻¹ and the *T*_g value was collected from the inclination point on the second heating curve.

Size exclusion chromatography (SEC) was realized at room temperature for the determination of absolute molecular weights of the polymers. A high performance size exclusion chromatography (HPSEC) was coupled to a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscosimeter and a differential refractive index (dRI) detector. THF was used as the carrier phase and was filtered through a 0.1 μm filter unit (Millipore, Billerica, USA), It was degassed (DGU-20 A3R Shimadzu, Kyoto Japan) and eluted at a 0.5 mL min⁻¹ flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto Japan). 100 μL of a 0.2 μm-filtered sample solution (*C* = 10 mg mL⁻¹) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto Japan). The column packing was a divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Sanata Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga–As laser (λ = 665.8 nm). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar masses were obtained with a Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL g⁻¹).¹⁵

β-lactone synthesis

As shown in the Scheme 1, α,α,β-trisubstituted β-lactones with benzylic ester and hexylic ester groups were prepared in five steps from the precursor diethyl oxalpropionate, following the protocols described in the literature.^{16–18}

4-carboxyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone [3] (Fig. 5a). This product is obtained by the catalytic hydrogenolysis of the benzylic β-lactone [1]. Benzylic β-lactone [1] (500 mg, 2.13 mmol) was dissolved in 20 mL of acetone. Pd/charcoal (50 mg, 10% of total mass) was then added. The air in the flask was vacuumed and replaced with H₂ gas. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature and filtered through a 0.2 μm PTFE membrane. After evaporating the solvent, the final product (acidic β-lactone) [3] was obtained as a white powder, with a yield of 94%. *R*_f = 0.60. *T*_m = 48 °C. ¹H NMR, 400 MHz,

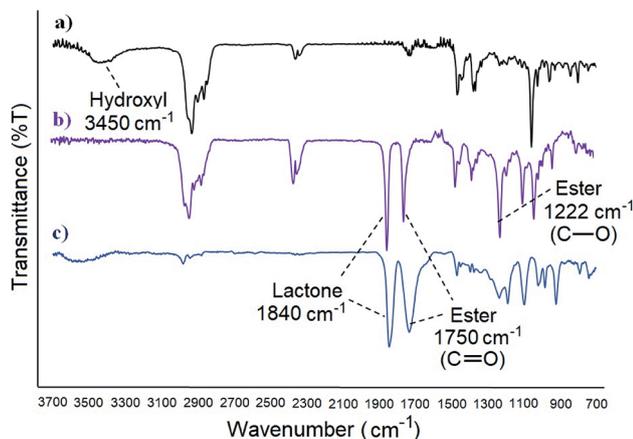


Fig. 2 FT-IR spectra of: (a) cholesterol, (b) cholesterolic β-lactone [4], (c) acidic β-lactone [3].

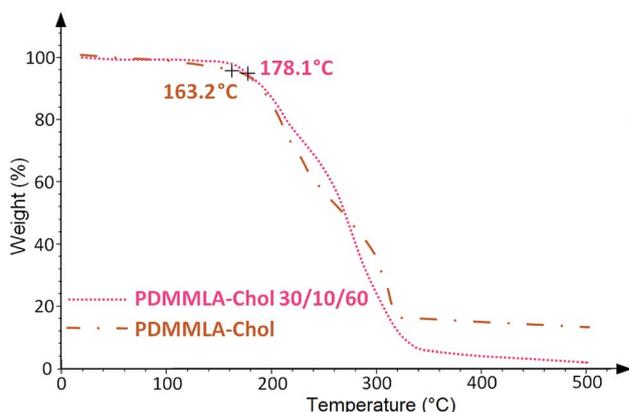


Fig. 3 TGA curves of PDMMLA–Chol, and PDMMLA–Chol 30/10/60.



Table 1 Melting point of the β -lactones and thermal analysis results of the polymers before and after cholesterol grafting

	T_d ($^{\circ}\text{C}$)	T_g^a ($^{\circ}\text{C}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
Acidic β -lactone	—	—	48
Cholesterolic β -lactone	—	—	160
PDMMLA-H	Undetermined	69.9	—
PDMMLA-Chol	163.2	106.6	—
PDMMLA 40/60	198.1	23.7	—
PDMMLA-Chol 30/10/60	178.1	25.7	—

^a Determined by DSC at second heating.

(CDCl_3) δ_{H} (ppm): 1.30 (s, 3H, H_e), 1.51 (s, 3H, H_f), 4.67 (s, 1H, H_d). ^{13}C NMR, 100 MHz, (CDCl_3) δ_{C} (ppm): 17.52, 21.90 (C_e, C_f), 58.50 (C_c), 78.10 (C_d), 168.35, 17.97 (C_b, C_g). Elemental analysis for $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$ calculated theoretically: C: 50.00, H: 5.62; obtained experimentally, C: 49.86, H: 6.41.

Cholesterolic β -lactone [4] (Fig. 5b). Acidic β -lactone [3] (100 mg, 0.69 mmol, 1 eq.), cholesterol (267 mg, 0.69 mmol, 1 eq.), and DMAP (48 mg, 0.39 mmol 10% of the total mass) were placed in a round-bottom flask under nitrogen atmosphere and dissolved in 70 mL of freshly distilled THF at 0°C . DCC (150 mg, 0.69 mmol, 1 eq.), was separately dissolved in anhydrous THF and added to the previous mixture. After 15 minutes, the reaction medium was brought to room temperature and stirred for 48 h. The final product was purified by flash chromatography using the eluent cyclohexane/ethyl-acetate (8/2). A white solid was obtained with a yield of 49%. $R_f = 0.85$. $T_m = 160^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR, 400 MHz, (CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.63 (s, 1H, H_{18}), 0.88 (dd, 6H, $\text{H}_{26}, \text{H}_{27}$), 0.93 (d, 3H, H_{21}), 0.98 (m, 1H, H_9), 1–1.62 (aliphatics $\text{H}_1, \text{H}_2, \text{H}_8, \text{H}_{11}\text{--}\text{H}_{17}, \text{H}_{20}, \text{H}_{22}\text{--}\text{H}_{25}$), 1.03 (s, 3H, H_{19}), 1.24 (s, 1H, H_e), 1.51 (s, 1H, H_f), 1.85 (m, 2H, H_7), 2.01 (m, 2H, H_{12}), 2.28 (m, 2H, H_4), 4.52 (s, 1H, H_d), 4.74 (m, 1H, H_3), 5.37 (d, 1H, H_6). ^{13}C NMR, 100 MHz, (CDCl_3): δ_{C} (ppm): 11.81 (C_{18}), 17.54 (C_e), 18.45 (C_{21}), 19.42 (C_{19}), 21.09 (C_{11}), 22.07 (C_f), 22.58 (C_{27}), 22.84 (C_{26}), 23.84 (C_{15}), 24.31 (C_{23}), 28.03 (C_{16}), 28.25 (C_{25}), 31.66 (C_7), 31.90 (C_8), 35.80 (C_{10}), 36.20 (C_{20}), 36.51 (C_{22}), 37.26 (C_1), 39.53 (C_{12}), 39.78 (C_{24}), 42.30 (C_{13}), 42.32 (C_4), 50.13 (C_9), 56.11 (C_{14}), 57.72 (C_c), 56.65 (C_{17}), 71.81 (C_3), 76.06 (C_d), 121.74 (C_6), 140.76 (C_5), 166.74, 172.96 (C_b, C_g). Elemental analysis for

$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4$ calculated theoretically: C: 76.90, H: 10.20; obtained experimentally: C: 76.32, H: 10.43.

Polymer synthesis

The synthesis of the homopolymer¹⁹ and the copolymer⁵ was realized as described in the literature, using the β -lactones [1] and [2] as monomers, and tetraethyl-ammonium benzoate ($\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCOO}^-$) as initiator. A monomer/initiator ratio (M/I) of 5×10^3 was applied for all polymers.

Copolymer PDMMLA 40/60 (Fig. 5c). Copolymer PDMMLA 40/60 (Fig. 5c) was prepared for the first time. Benzylic β -lactone [1] (1.1 g, 4.67 mmol, 0.4 eq.) and (hexylic β -lactone) [2] (1.6 g, 7.01 mmol, 0.6 eq.) were dissolved in 100 mL of freshly distilled THF. The lactone solution was then added to a round bottom flask containing the initiator $\text{Et}_4\text{N}^+ \text{PhCOO}^-$ (14.64 mg, 0.058 mmol, 5×10^{-3} eq.) under nitrogen atmosphere. After confirmation of the polymerization by FT-IR, 2 to 4 drops of acetic acid were added. The formed polymer was isolated by precipitation in ethanol. A catalytic hydrogenolysis using Pd/C (1.1 g) and H_2 gas was then carried out on the copolymer in order to remove the benzylic groups. PDMMLA 40/60 was thus obtained. Yield: 96%; $M_n = 29.630 \text{ g mol}^{-1}$; $M_w = 29.640 \text{ g mol}^{-1}$; $D = 1.000$. ^1H NMR, 400 MHz, (CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.81 (s, 3H, H_i), 1.22 (s, 12H, $\text{H}_f, \text{H}_e, \text{H}_k, \text{H}_j, \text{H}_l$), 1.54 (s, 2H, H_h), 4.06 (s, 2H, H_g), 5.26 (s, 1H, H_b). ^{13}C NMR, 100 MHz, (CDCl_3) δ_{C} (ppm): 13.99 (C_l), 22.49 (C_f, C_e), 26.31 (C_k), 32.22 ($\text{C}_i, \text{C}_j, \text{C}_k$), 45.98 (C_c), 66.28 (C_g), 77.14 (C_b), 168.26 (C_a), 173.76 (C_d).

Cholesterolic homopolymer [PDMMLA-Chol] (Fig. 5d). Cholesterol was grafted to the homopolymer following the same protocol as for the product [4], using the following quantities of reactants: PDMMLA-H (40 mg, 0.27 mmol, 1 eq.), cholesterol (104 mg, 0.27 mmol, 1 eq.), DMAP (20 mg, 0.16 mmol, 10% of the total mass) and DCC (56 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) in 70 mL of anhydrous THF. The mixture was stirred under nitrogen atmosphere for 48 h at room temperature. After the reaction, THF was eliminated. The product was then dissolved in a little amount of chloroform and purified by precipitation in cyclohexane. PDMMLA-Chol is obtained as a white powder with a yield of 46%. ^1H NMR, 400 MHz, (CDCl_3) δ_{H} (ppm): 0.68 (s, 3H, H_{18}), 0.85 (d, 3H, H_{26}), 0.97 (d, 3.05H, H_{27}), 0.93 (d, 3.02H, H_{21}), 0.98 (m, 3H, H_{19}), 1–2.28 (35H, aliphatic $\text{H}_1\text{--}\text{H}_4, \text{H}_7\text{--}\text{H}_9, \text{H}_{11}\text{--}\text{H}_{17}, \text{H}_{20}, \text{H}_{22}\text{--}\text{H}_{25}, \text{H}_f, \text{H}_e$), 3.40 (m, 1.04H, H_3), 5.23 (s, 1.05H, H_b), 5.37 (d, 1.04H, H_6). ^{13}C NMR, 100 MHz, (CDCl_3): δ_{C} (ppm):

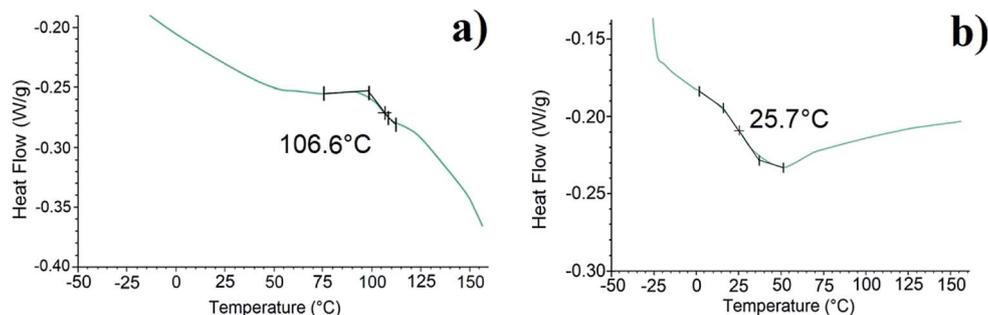


Fig. 4 DSC curves of (a) PDMMLA-Chol, (b) PDMMLA-Chol 30/10/60, zoomed in on the inclination point of the second heating curve.



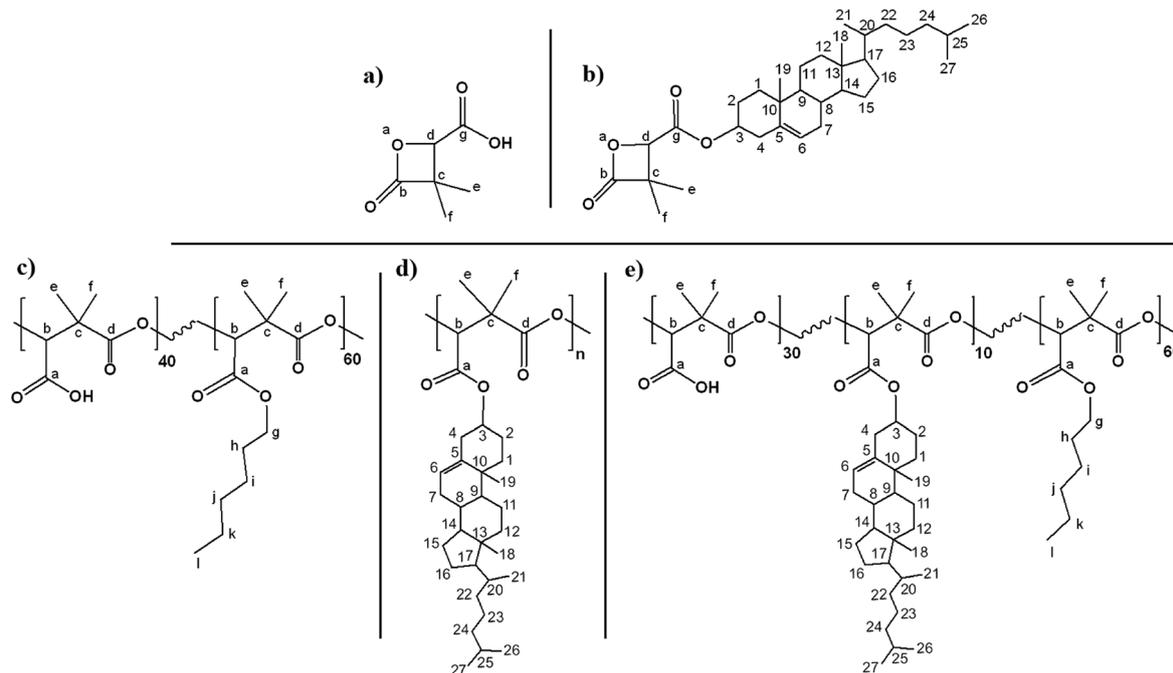


Fig. 5 Chemical structures of the synthesized molecules; (a) acidic β -lactone [3], (b) cholesterolic β -lactone [4], (c) PDMMLA 40/60, (d) PDMMLA–Chol, (e) PDMMLA–Chol 30/10/60.

11.94 (C_{18}), 18.86 (C_{21}), 19.47 (C_{19}), 18.90 (C_e), 21.11 (C_{11}), 22.53 (C_f), 22.61 (C_{27}), 22.90 (C_{26}), 23.86 (C_{15}), 24.32 (C_{23}), 28.07 (C_{16}), 28.30 (C_{25}), 31.57 (C_7), 31.86 (C_8), 35.84 (C_{10}), 36.17 (C_{20}), 36.48 (C_{22}), 37.28 (C_1), 39.55 (C_{12}), δ_C 39.81 (C_{24}), 42.28 (C_{13}), 42.40 (C_4), 45.16 (C_c), 50.17 (C_9), 56.90 (C_{14}), 58.32 (C_{17}), 72.14 (C_3), 76.12 (C_b), 121.85 (C_6), 140.76 (C_5), 167.98 (C_a), 173.20 (C_d).

Cholesterolic terpolymer [PDMMLA–Chol 10/30/60] (Fig. 5e). Same protocol was employed using the following quantities of reactants: PDMMLA 40/60 (100 mg, 0.43 mmol, 1 eq.), cholesterol (16.69 mg, 0.043 mmol, 0.1 eq.), DMAP (12.61 mg, 0.10 mmol, 10% of the total mass), and DCC (8.90 mg, 0.043 mmol, 0.1 eq.). After precipitation in cyclohexane, PDMMLA 10/30/60 was obtained as a white powder with a yield of 38%. 1H NMR, 400 MHz, ($CDCl_3$) δ_H (ppm): 0.66 (s, 0.27H, H_{18}), 0.83 (m, 6.19H, H_{26} , H_{27} , H_i), 0.94 (d, 0.26H, H_{21}), 1.05 (m, 0.25H, H_9), 1.1–1.50 (30.09H, aliphatic H_1 , H_2 , H_8 , H_{11} – H_{17} , H_{20} , H_{22} – H_{25} , H_e , H_f , H_k , H_j , H_i , H_j), 1.54 (s, 2.56H, H_h), 1.88 (m, 0.15H, H_7), 1.92 (m, 0.10H, H_{12}), 2.20 (m, 0.19H, H_4), 3.45 (m, 0.09H, H_3), 4.05 (m, 2.03H, H_g), 5.28 (d, 1.11H, H_6 , H_b). ^{13}C NMR, 100 MHz, ($CDCl_3$): δ_C (ppm): 11.87 (C_{18}), 13.98 (C_i), 18.72 (C_f), 19.40 (C_{21}), 19.45 (C_{19}), 21.11 (C_{11}), 22.9 (C_e), 22.56 (C_{27}), 22.88 (C_{26}), 23.81 (C_{15}), 24.36 (C_{23}), 25.40 (C_j), 28.10 (C_{16}), 28.24 (C_{25}), 28.39 (C_k), 29.72 (C_i), 30.32 (C_h), 31.31 (C_7), 31.93 (C_8), 35.78 (C_{10}), 36.19 (C_{20}), 36.53 (C_{22}), 37.23 (C_1), 39.52 (C_{12}), 39.80 (C_{24}), 42.19 (C_{13}), 42.37 (C_4), 45.20 (C_c), 50.09 (C_9), 56.14 (C_{14}), 59.76 (C_{17}), 65.91 (C_g), 72.06 (C_3), 76.06 (C_b), 121.76 (C_6), 140.71 (C_5), 167.73 (C_a), 173.12 (C_d).

Conclusion

The purpose of this work was to study the possibility and efficiency of grafting functional groups on the chemically modifiable side chain of PDMMLA polymers. This grafting can be carried out on

PDMMLAs with different functional groups and drugs having a hydroxyl, amine or sulfur function for various biomedical applications. For this reason, chemical grafting study on PDMMLAs was carried out with cholesterol having a simple chemical structure and only one functional group ($-OH$). A β -lactone derived from the monomer units of PDMMLA and polymers having 100% and 40% $-COOH$ groups on their respective side chains (PDMMLA–H and PDMMLA 40/60, respectively) were used in this work. An ester bond was formed between the carboxylic acid group of the monomer/polymer and the hydroxyl group of the cholesterol following a Steglich esterification. NMR analysis allowed to confirm and quantify the grafting percentage, which prove the efficiency of the practiced grafting procedure (100% concordance with theoretical grafting percentage). 1H NMR and FT-IR spectra show evident results confirming the grafting. TGA and DSC measurements show also the modification brought to the polymers due to the addition of the cholesterol to the basic structure of each polymer. Increases in glass transition temperature are a good indication to the addition of rigidity to the polymers' structure.

PDMMLA is a biocompatible and biodegradable polymer, developed in our team for biomedical applications. These experiments allowed to confirm the possibility of covalent grafting on PDMMLA derivatives (homopolymer or copolymer). Future works will be oriented to grafting a veritable active drugs on these polymers in order to improve healing conditions in medical intervention cases.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.



Acknowledgements

We thank Nadia Bouchemal (Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH – CSPBAT-UMR 7244, group NBD) and Véronique Bennevault (Sorbonne Université, IPCM-UMR 7610, group LCP) for their cooperation and support in the preparation of this paper.

References

- 1 R. Belibel, T. Avramoglou, A. Garcia, C. Barbaud and L. Mora, *Mater Sci Eng C*, 2016, **59**, 998.
- 2 R. Belibel, C. Barbaud and L. Mora, *Mater Sci Eng C*, 2016, **69**, 1192.
- 3 R. Belibel, N. Marinval, H. Hlawaty and C. Barbaud, *Polym. Degrad. Stab.*, 2016, **130**, 288.
- 4 R. Belibel, S. Sali, N. Marinval, A. Garcia-Sanchez, C. Barbaud and H. Hlawaty, *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **117**, 111284.
- 5 F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guérin and C. Barbaud, *Des. Monomers Polym.*, 2005, **8**, 25.
- 6 R. Belibel, I. Azzouz and C. Barbaud, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2016, **54**, 1495.
- 7 R. K. Mann and P. A. Beachy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 2000, **1529**, 188.
- 8 F. Schmidt, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer and B. König, *Synth. Commun.*, 2011, **41**, 2876.
- 9 V. Gilles, M. A. Vieira, V. Lacerda, *et al.*, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2015, **26**, 74.
- 10 B. Neises and W. Steglich, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1978, **17**, 522.
- 11 A. B. Lutjen, M. A. Quirk, A. M. Barbera and E. M. Kolonko, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 5291.
- 12 S. El-Sayed, K. H. Mahmoud, A. A. Fatah and A. Hassen, *Phys. B Condens. Matter*, 2011, **406**, 4068.
- 13 N. A. Grunina, T. V. Belopolskaya and G. I. Tsereteli, *J. Phys. Conf.*, 2006, **40**, 105.
- 14 B. Gornicka and L. Gorecki, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2010, **101**, 647.
- 15 F. E. Kohn, J. W. A. Van Den Berg, G. Van De Ridder and J. Feijen, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1984, **29**, 4265.
- 16 C. Barbaud, M. Guerrouache and P. Guérin, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 9513.
- 17 C. Barbaud, F. Abdillah, F. Fabienne, M. Guerrouache and P. Guérin, *Des. Monomers Polym.*, 2003, **6**, 353.
- 18 R. Belibel and C. Barbaud, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2015, **53**, 2586.
- 19 C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa and P. Guérin, *Macromol. Chem. Phys.*, 2004, **205**, 199.



Etudes de la conception et des différentes propriétés d'un nouveau revêtement bioactif de stents endovasculaires à base de poly(acide [R,S]-3,3-diméthylmalique) (PDMMLA)

Le traitement de l'athérosclérose nécessite la pose d'un stent métallique dans la lumière d'un vaisseau sanguin endommagé. Cependant, le phénomène de resténose intra-stent est observé chez 20 à 30% des patients.

L'objectif de cette thèse est de développer un nouveau revêtement de stents, composé d'un polymère bioactif dans le but d'inhiber la resténose intra-stent. Les PDMMLAs sont de nouveaux polyesters biodégradables, synthétisés par une voie de polymérisation anionique par ouverture de cycle des β -lactones α,α,β -tri-substituées. La synthèse à façon des PDMMLAs permet d'obtenir des copolymères amphiphiles avec des proportions d'hydrophilie modulables. Dans le cadre de cette thèse, après la synthèse multi-étapes de différents dérivés de PDMMLA, une analyse des propriétés physicochimiques de surface a été réalisée en étudiant les profils d'adhésion des protéines sur ces surfaces. Parallèlement à ces études, le greffage covalent de molécules, notamment d'un principe actif sur les dérivés de PDMMLA a été effectué. Les résultats de l'étude de la libération du principe actif greffé, ainsi que les premiers résultats des études biologiques étant prometteurs, le PDMMLA, accompagné de son principe actif est un bon candidat pour des applications biologiques. Ce nouveau polymère greffé doit être davantage étudié afin d'améliorer ses propriétés mécaniques qui sont également des critères importants dans la conception des dispositifs médicaux.

Mots clés : Resténose intra-stent, Polymères biodégradables, Dérivés de PDMMLA, Propriétés de surface, Greffage covalent de principes actifs, Libération contrôlée, Comportement des HUVECs

Studies of the design and different properties of a novel bioactive coating for endovascular stents based on poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA)

Atherosclerosis, one of the frequent cardiovascular diseases, is treated by placing a metal stent in the blocked artery. However, an intra-stent restenosis is observed in 20 to 30% of patients.

The objective of this thesis is to develop a new bioactive polymer for cardiovascular stent coating, which would inhibit arterial restenosis. PDMMLAs are new biodegradable polyesters, synthesized through an anionic ring opening polymerization of α,α,β -tri-substituted β -lactones. The tailored synthesis of PDMMLAs allows to prepare amphiphilic copolymers with adjustable hydrophilicity proportions. As part of this thesis, after the multi-step synthesis of different PDMMLA derivatives, a surface physicochemical properties analysis was carried out by studying the adhesion profiles of different proteins on these surfaces. In parallel, the covalent grafting of molecules, especially of an active drug was accomplished on PDMMLA derivatives. Promising results were obtained regarding the release profile and kinetics of the grafted active drug and the biological studies, indicating that the drug-grafted PDMMLA is a good candidate for biological applications. This new polymer needs further studies to improve its mechanical properties and other aspects, which are also important criteria in the development of medical devices.

Keywords: In-stent restenosis, Biodegradable polymers, PDMMLA derivatives, Surface properties, Covalent grafting of active drugs, controlled release, HUVEC behavior