



HAL
open science

Conception et validation d'un revêtement mimétique de l'endothélium pour une intégration optimale des dispositifs endovasculaires

Jean Sénémaud

► **To cite this version:**

Jean Sénémaud. Conception et validation d'un revêtement mimétique de l'endothélium pour une intégration optimale des dispositifs endovasculaires. Immunologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5237 . tel-04792405

HAL Id: tel-04792405

<https://theses.hal.science/tel-04792405v1>

Submitted on 20 Nov 2024

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 Paris Cité

École Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle LVTS / Bichat (UMR_S 1148)

Equipe Immunobiologie Cardiovasculaire

par Jean SENEMAUD

THESE DE DOCTORAT EN IMMUNOLOGIE

Conception et Validation d'un Revêtement Mimétique de l'Endothélium pour une Intégration Optimale des Dispositifs Endovasculaires

Dirigée par **Giuseppina CALIGIURI**

et co-dirigée par **Yves CASTIER**

Soutenue publiquement le 11 décembre 2023 devant un jury composé de :

Anne LEJAY, PUPH, Université de Strasbourg, Rapportrice

Fabien LAREYRE, PH-HDR, Université Côte d'Azur, Rapporteur

Pascal DESGRANGES, PU-PH, Université Paris-Est Créteil, Examinateur

Salma EL BATTI, PU-PH, Université Paris Cité, Examinatrice

Giuseppina CALIGIURI, DR, Université Paris Cité, Directrice de Thèse

Yves CASTIER, PU-PH, Université Paris Cité, Co-directeur de Thèse

RESUMÉ

Titre : Conception et Validation d'un Revêtement Mimétique de l'Endothélium pour une Intégration Optimale des Dispositifs Endovasculaires

Introduction : Les dispositifs endovasculaires (DE, tels que les stents et flow-diverters) ont grandement enrichi l'arsenal thérapeutique pour les pathologies artérielles. Toutefois, une réaction pathologique de l'hôte, déclenchée par le DE lui-même, limite les résultats à moyen et long terme des traitements endovasculaires. De nouvelles générations de stents à élution ont été développés pour répondre à cette problématique. Toutefois, les médicaments élus ne sont pas sélectifs et limitent la prolifération et la migration des cellules endothéliales plutôt que de promouvoir l'intégration des DE. L'objectif de cette étude était de concevoir un revêtement de DE capable de leur conférer les propriétés trans-homophiles du CD31 (qui est la plus abondante glycoprotéine homéostatique de la circulation) pour 1-désamorcer la réaction inflammatoire initiale induite par l'implantation de DE et 2-promouvoir une réparation artérielle sans formation de néo-intima des vaisseaux receveurs.

Méthodes : Cinq séquences peptidiques synthétiques (IRBM, Italie) mimétiques du domaine 1 et 2 du CD31 ont été conçues et immobilisées par chimie-click sur des disques de nitinol et de cobalt-chrome (CoCr, AlchiMedics, France) fonctionnalisés à la polydopamine (PDA). La réaction de cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) à la surface de ces alliages a été évaluée par microscopie à fluorescence en utilisant le ratio d'expression du CD31 et d'expression du stress du cytosquelette (phalloïdine, marquant les fibres F-actine de stress) après culture de 24h (AxioObserver®, Zeiss, Germany). Le peptide montrant la plus grande capacité à favoriser l'endothélialisation de surfaces inorganiques (SP1072) a été immobilisé à la surface de flow-diverters (AlchiMedics). Ces DE furent implantés dans les aortes abdominales saines et dans des anévrismes sacculaires de l'artère sous-clavière droite générés par élastase chez le lapin. Parallèlement, des stents en CoCr fonctionnalisés avec le SP1072 furent implantés dans des aortes abdominales et artères iliaques saines de lapin. La biocompatibilité de ces DE mimant l'action du CD31 a été évaluée « en face » par microscopie électronique à balayage et par des coupes histologiques axiales des segments artériels à divers intervalles de temps après implantation. Chaque expérimentation comprenait un groupe contrôle (nu pour les flow-diverters, nu, PDA et sirolimus pour les stents, n=2 à 3/groupe/temps).

Résultats : Les HAEC ensemencées sur les disques d'alliage de nitinol et de CoCr fonctionnalisés avec les peptides CD31 présentaient de façon significative un ratio CD31/F-actine plus important par rapport aux disques contrôles (non fonctionnalisés, $p < 0.01$). Les DE fonctionnalisés avec le peptide SP1072 étaient totalement endothélialisés à J + 7 *in vivo* avec une agrégation leucocytaire et plaquettaire

décrite par rapport aux DE nus en microscopie électronique. L'analyse histologique des anévrismes sacculaires et des vaisseaux sains retrouvait une face luminale des DE fonctionnalisés recouverte par une néo-intima plus fine et une moindre adhésion leucocytaire et plaquettaire par rapport aux DE nus, et ce à chaque intervalle de temps. Une organisation du thrombus était également plus importante dans le groupe de flow-diverters fonctionnalisés.

Conclusion : L'utilisation de surfaces mimant l'endothélium, obtenues par l'immobilisation de peptides synthétiques possédant les propriétés trans-homophiles du CD31, favorise l'endothélialisation et réduit la réaction biologique pathologique des cellules interagissant avec les DE. Nos résultats préliminaires démontrent la faisabilité de la fonctionnalisation de tels DE, et qu'un tel traitement de surface améliore leur biocompatibilité. Ces résultats nécessitent des études plus poussées *in vivo*, ouvrant potentiellement la voie à une amélioration des résultats cliniques des DE.

Mots-clés : CD31, stents, revêtement, endothélium, intégration, biomimétique, endovasculaire

Title: Design and Assessment of an Endothelial-Mimetic Coating for Enhancing Arterial Healing and Integration of Endovascular Devices

Introduction: Percutaneous implantation of stents and flow diverters has considerably expanded the capabilities of vascular surgical interventions. However, a pathologic host reaction triggered by the device itself most often hampers the success of endovascular arterial repair (EAR). New generations of drug-eluting stents were developed to address this issue, releasing anti-proliferative agents. However, none of the latter are selective, and they actually inhibit the proliferation and migration of endothelial cells. The objective of this study was to develop a novel coating able to provide the device surface with the trans-homophilic properties of CD31, the most abundant homeostatic glycoprotein within the circulation, in order to 1-disable the initial chronic inflammation linked to the presence of the stent and 2-promote the early healing of implanted arteries without the formation of a neointima despite the absence of drug.

Methods: Five synthetic peptides (IRBM, Italy) sequences potentially mimicking the trans-homophilic facets of CD31 domains 1 and 2 were immobilized by click chemistry onto nitinol and cobalt-chromium (CoCr) polydopamine-functionalized flat discs of EAR device-compatible alloys (AlchiMedics, France). The reaction of Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) at the contact with the experimental surfaces was evaluated by fluorescence microscopy analysis of the ratio between the extent of surface CD31 expression and that of the cytoskeleton stress (phalloidin, staining polymerized F-actin fibers), after a 24-h culture (AxioObserver®, Zeiss, Germany). The peptide displaying the highest ability to favor the endothelialization of the inorganic surface (SP1072) was immobilized on nitinol flow diverters (AlchiMedics) implanted in the abdominal aorta and well as in the right subclavian artery submitted to the elastase saccular aneurysm model, in rabbits. CoCr stents coated with the SP1072 peptide were also implanted in the abdominal aorta of rabbits. The biocompatibility of such endothelial-mimetic implanted devices was evaluated *en face*, by scanning electron microscopy (SEM) and in serial cross-sections of histological preparations of the devices implanted in the native arteries and in subclavian aneurysms at different timepoints. Control groups were implanted with bare metal devices (n = 2 to 3 rabbit/group/time point).

Results: HAECs cultured on the experimental discs showed significant higher CD31/F-actin ratio compared to control disks ($p < .01$). Flow-diverters and CoCr stents coated with the SP1072 peptide, selected through the *in vitro* screening, showed complete stent endothelialization and less leukocyte and platelet adhesion at the native aortic location by SEM analysis, as compared to the bare group. Histological analysis of the subclavian aneurysm locations demonstrated that the endothelial-mimetic surface was covered by a thinner neo-intima accompanied by a lower extent of leukocyte and platelet adhesion at all timepoints. Furthermore, for a similarly effective aneurysm exclusion, the risk of

aneurysmal sac rupture was consistently reduced in the endothelial-mimetic implanted group, as detected by the complete organization of the thrombus and the thickness of the aneurysmal sac.

Conclusion: The endothelial-mimetic surface obtained by the immobilization of synthetic trans-homophilic CD31 peptides favors the endothelialization and reduces the pathologic biological reaction of the cells interacting with endovascular devices. If confirmed by larger in vivo studies, the biocompatibility conferred by endothelial-mimetic devices could significantly improve the outcome of EAR procedures.

Keywords: CD31, stents, coating, endothelium, integration, bio-mimetic, endovascular

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du Jury qui ont accepté d'examiner mes travaux. Je souhaite remercier mes rapporteurs, Anne Lejay et Fabien Lareyre pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit.

Merci aux Prs. Salma El Batti et Pascal Desgranges qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance.

Mon immense reconnaissance va à Charles Skarbek sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Merci pour ta grande patience, ta pédagogie, ta disponibilité et ton implication majeure qui m'ont énormément apporté. Je tiens également à te dire à quel point j'ai été heureux de travailler à tes côtés et suis admiratif de tes qualités tant professionnelles qu'humaines.

Je remercie chaleureusement Christophe Bureau (Alchimedics, Sinomed), Isabelle Lefèvre (Alchimedics), Elisabetta Bianchi (IRBM) Zongcheng Pan et Ran Song (Sinomed) pour leur précieuse contribution dans nos travaux, dont la valorisation souligne la réussite de notre collaboration.

Ma chère Pina, je te remercie infiniment d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir transmis ta passion et ton exigence scientifique. Je suis extrêmement honoré d'avoir pu participer à cette aventure de la fonctionnalisation et reste admiratif de ce travail gigantesque que tu as initié et poursuivi avec détermination. Une belle collaboration initiée dès 2016 avec mon M2 dans l'unité, que je suis déterminé à poursuivre.

J'ai été extrêmement fier de travailler aux côtés du Pr. Yves Castier qui a co-dirigé cette thèse. Qu'il voit ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance pour sa confiance, ses conseils et sa bienveillance. Je le remercie particulièrement de m'avoir permis de conduire ces travaux et d'avoir pu participer aux différents projets du service, qui aura toujours une place à part dans mon cœur.

Je remercie également l'intégralité de l'Unité INSERM U1148 dirigée par Didier Letourneur, dont j'ai apprécié la très grande qualité scientifique et également humaine. Je remercie particulièrement toute l'Equipe 1, que je connais depuis de nombreuses années.

Je poursuis bien entendu par Antonino Nicoletti qui dirige l'équipe. Tony, j'ai difficilement les mots pour te remercier de ta bienveillance et de tes nombreux conseils qui m'ont permis d'arriver à mon (modeste) niveau actuel. Au cours de ma carrière, j'ai croisé peu de personnes aussi impliquées et motivantes que toi, dont la connaissance excède de loin le simple champ scientifique.

Un immense merci à Sandrine, Marie, Marc et Greg pour leur amitié et regard critique, qui ont eu beaucoup plus d'impact (positif !) sur ma réflexion scientifique qu'ils ne le pensent.

Je salue et remercie Guigui et Lele pour leur aide précieuse et leur immense gentillesse.

Un très grand merci à Mélodie (et toutes mes félicitations !) pour sa très grande disponibilité et immense gentillesse pour mes nombreuses questions et pour son aide logistique.

Je salue et remercie Charlotte Rasser et Jonathan Cortese pour leurs travaux antérieurs dans l'unité, sur lesquels s'appuient les nôtres.

Je remercie Véronique Arocas et Thomas Lelant pour leur aide précieuse ainsi que Christine Choqueux

Je remercie également Rachida, Jamila, Sabrina et Anh-Thu et tenais également à remercier Raphael Coscas et Jean-Baptiste Michel, à qui je dois tant.

Enfin, je remercie ma famille pour leur amour et surtout ma femme Géraldine pour son soutien inconditionnel durant toutes ces années, sans qui je ne serai pas complet (comme le CD31 !).

TABLE DES MATIERES

RESUMÉ	2
REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
TABLE DES FIGURES	10
ABRÉVIATIONS	13
A. INTRODUCTION	14
I. DISPOSITIFS ENDOVASCULAIRES : FLOW-DIVERTERS, STENTS CORONAIRES ET STENTS PERIPHERIQUES	14
I.1. FLOW DIVERTERS.....	14
I.2. STENTS CORONAIRES ET PERIPHERIQUES.....	16
I.2.a. Stents non couverts.....	16
I.2.b. Résultats histologiques après implantation de stents nus.....	17
I.3.c. Stents actifs.....	19
I.3.d. Stents biorésorbables.....	21
I.3.e. Stents couverts.....	21
I.3. f. Le stent « idéal » : Quelles caractéristiques ?.....	23
II. CD31 ET PEPTIDES MIMETIQUES	24
II.1. STRUCTURE DU CD31.....	24
II.2. FONCTIONS CELLULAIRES DU CD31.....	25
II.2.a. CD31 et plaquettes.....	25
II.2.b. CD31 et leucocytes.....	25
II.2.c. CD31 et cellules endothéliales.....	26
II.3. ENGAGEMENT PHYSIOLOGIQUE ET CLIVAGE DU CD31.....	26
II.4. IDENTIFICATION DE PEPTIDES CIBLANT LA PORTION CIS- OU TRANS-HOMOPHILE DU CD31.....	29
II.4.a. Peptides ciblant la portion cis-homophile du CD31.....	29
II.4.b. Peptides ciblant la portion trans-homophile du CD31.....	30
III. RATIONNEL DE LA THESE ET HYPOTHESES	33
B. OBJECTIFS DE LA THESE	34
C. TRAVAUX EXPERIMENTAUX	35
I. CONCEPTION ET CRIBLAGE DES PEPTIDES MIMETIQUES DU CD31	35
I.1. IDENTIFICATION DES SEQUENCES IMPLIQUEES DANS L'INTERACTION TRANS-HOMOPHILE DU CD31.....	35
I.2. IMMOBILISATION DES PEPTIDES CANDIDATS PAR « CHIMIE-CLICK » SUR COUCHE DE POLYDOPAMINE ET CARACTERISATION DU REVETEMENT IN SILICO.....	40
II. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES SURFACES COATES IN VITRO	47

II.1. ENDOTHELIALISATION ET PHENOTYPE	47
II.2. HEMOCOMPATIBILITE	55
II.2.a. Hémolyse dans les surfaces nues et traitées.....	55
II.2.b. Réaction des éléments figurés du sang au contact des surfaces nues et traitées	57
III. TRANSFERT DE LA TECHNIQUE DE REVETEMENT SUR DES DISPOSITIFS ENDOVASCULAIRES	60
III.1. FLOW DIVERTERS.....	60
III.2. STENTS EN COBALT-CHROME	61
III.3. STENTS COUVERTS EN COCr ET PTFE	62
IV. EVALUATION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES SURFACES COATEES IN VIVO	71
IV.1. FLOW-DIVERTERS EN NITINOL	73
IV.2. STENTS NON COUVERTS EN COCr	81
D. DISCUSSION	87
I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET TRANSLATIONNEL DU PROJET	87
I.1. POURQUOI TRAVAILLER A UN REVETEMENT DE STENT AUJOURD’HUI ?	87
II. CONSIDERATIONS TECHNIQUES ET TRANSLATIONNEL DU PROJET	91
II.1. CHOIX DE LA TECHNIQUE : POURQUOI LE DIP-COATING ?	91
II.2. CHOIX DE LA COUCHE FONCTIONNELLE : POURQUOI LA POLYDOPAMINE ?	94
II.3. CONSIDERATIONS AUTOUR DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE NOTRE REVETEMENT	96
II.4. UN CHANGEMENT DE PARADIGME DU STENTING ARTERIEL : DE L’ENDOTHELIALISATION AU PHENOTYPE DE L’ENDOTHELIUM.....	97
II.5. REVETEMENT CD31 MIMETIQUE : POURQUOI AVOIR CIBLE PRECISEMENT LES DOMAINES PROXIMAUX DU CD31?.....	99
II.6. REACTION ENDOTHELIALE <i>IN VITRO</i> : PHENOTYPE ET CROISSANCE.....	99
III. LIMITATIONS ET PERSPECTIVES	103
III.1. LIMITATIONS.....	103
III.2. APPLICATIONS POTENTIELLES DES DISPOSITIFS FONCTIONNALISES AVEC DES PEPTIDES MIMETIQUES DU CD31... ..	103
CONCLUSIONS.....	107
VALORISATION.....	108
BIBLIOGRAPHIE.....	109

ANNEXES 127

ANNEXE I: RESEARCH LETTER, BEHIND THE SCENES OF DISAPPOINTING LONG TERM EVAR RESULTS:
PATHOPHYSIOLOGICAL INSIGHTS AND FUTURE RESEARCH LEADS, EJVES, DEC 2020 **127**

ANNEXE II: RESEARCH LETTER, MOLECULAR IMAGING OF EXPERIMENTAL ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS TARGETING
VASCULAR HOMEOSTASIS DISRUPTION VIA CD31 SHEDDING, EJVES, DEC 2022 **130**

ANNEXE III: ARTICLE ORIGINAL (SOUVIS): CAMOUFLAGING ENDOVASCULAR STENTS WITH AN ENDOTHELIAL COAT
USING CD31 DOMAIN 1 MIMETIC PEPTIDES, BIOMIMETICS, SOUMIS LE 27 SEPTEMBRE 2023. **133**

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1: FLOW DIVERTER DE TYPE FRED (FLOW RE-DIRECTION ENDOLUMINAL DEVICE).....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.15
FIGURE 2 : ENDOTHELIALISATION D'UN FLOW-DIVERTER.	15
FIGURE 3: SCHEMA SIMPLIFIE DE LA REACTION A CORPS ETRANGER GENERE PAR L'IMPLANTATION D'UN MATERIEL ENDOVASCULAIRE (D'APRES (47))	18
FIGURE 4: VOIES D' ACTIONS DU PACLITAXEL ET DU SIROLIMUS SUR LE CYCLE CELLULAIRE	20
FIGURE 5: PHYSIOPATHOLOGIE SIMPLIFIEE DE LA STENOSE INTRA-STENT	22
FIGURE 6: CARACTERISTIQUES RECHERCHEES POUR LE DISPOSITIF ENDOVASCULAIRE « IDEAL ».	23
FIGURE 7: SCHEMA DU CD31.	24
FIGURE 8: ACTIVATION DU CD31 ET SIGNALISATION.	27
FIGURE 9: CONSIDERATIONS ASSOCIEES AUX APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DU CD31.....	32
FIGURE 10: INTERACTION TRANS-HOMOPHILE D'APRES PADDOCK (107).....	35
FIGURE 11: INTERACTION TRANS-HOMOPHILE DU CD31 SELON HU (132)	36
FIGURE 12. PEPTIDES MIMANT LE DOMAINE 1/2 DU CD31	37
FIGURE 13. MODELISATION TRIDIMENSIONNELLE DES PEPTIDES 745 ET 1376.....	37
FIGURE 14. MODELISATION TRIDIMENSIONNELLE DU PEPTIDE 1374 ET SPECTROSCOPIE RAMAN.	39
FIGURE 15. STRATEGIE DE FONCTIONNALISATION DE SURFACE	40
FIGURE 16. ANALYSE XPS DE SURFACE DE NITINOL NU ET FONCTIONNALISE A LA PDA.....	42
FIGURE 17: ANALYSE XPS DE SURFACE DE COBALT-CHROME NU ET FONCTIONNALISE A LA PDA (SELON RASSER).	42
FIGURE 18. STRUCTURE DU LINKER DBCO	43
FIGURE 19. ANALYSE XPS DES DISQUES DE NITINOL FONCTIONNALISES A CHAQUE ETAPE DU REVETEMENT.....	43
FIGURE 20. EVALUATION DE LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES PAR ANALYSE XPS.....	45
FIGURE 21. ANALYSE ET MESURE DE L'ÉPAISSEUR DU REVETEMENT EN AFM.....	45
FIGURE 22. DECONVOLUTIONS DES SERIES D'IMAGE EN AFM « EN FACE » ET VISUALISATION 3D DU REVETEMENT.	46
FIGURE 23. SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'ANALYSE DES CELLULES HAEC AU CONTACT DES MATERIAUX D'ETUDE.....	48
FIGURE 24. EXEMPLE D'IMAGES X10 EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DES PASTILLES DE NITINOL.....	48
FIGURE 25. EXEMPLE DE SCORE PHENOTYPIQUE DES CELLULES ENDOTHELIALES	49
FIGURE 26. SCORE PHENOTYPIQUE BASE SUR LE RATIO CD31/ACTINE F NORMALISE DE 0 A 1 POUR PERMETTRE LA COMPARAISON STATISTIQUES ENTRE TOUTES LES CONDITIONS SUR DISQUES DE NITINOL.	50
FIGURE 27. RESULTATS DE L'ANALYSE MULTIPLEX DANS LES DIFFERENTS GROUPES D'ETUDE.....	51
FIGURE 28. DOSAGE CD31 SOLUBLE DANS LES SURNAGEANTS DE DISQUES EN NITINOL AU CONTACT DE CELLULES ENDOTHELIALES.....	52
FIGURE 29. A. SCHEMA EXPERIMENTAL DU SCRATCH-ASSAY. B. IMAGES D'ACQUISITION DE L'INCUCYTE A H0, H+12 ET H+24 APRES REALISATION DU SCRATCH SUR DES CELLULES HAEC.....	53
FIGURE 30. CONFLUENCE SUR ZONE LESEE EN FONCTION DU TEMPS AVEC DIFFERENTES CONDITIONS.	54
FIGURE 31. VITESSE DE CONFLUENCE SUR ZONE LESEE EN FONCTION DU TEMPS AVEC DIFFERENTES CONDITIONS.	54
FIGURE 32. SCHEMA EXPERIMENTAL DU PROTOCOLE POUR LE TEST D'HEMOLYSE.....	55
FIGURE 33. RATIO D'HEMOLYSE DES SURFACES D'ETUDES APRES 1H D'INCUBATION ET PLAQUE CONTENANT DU PPP... ..	56
FIGURE 34. MICROSCOPIE A FLUORESCENCE EN CANAL CY3 DE DISQUES DE CoCr.	58
FIGURE 35. EXPRESSION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE MOYENNE DU CD61-P PAR CONDITION	58
FIGURE 36. FLOW-DIVERTERS EN NITINOL AVANT ET APRES 22H DE TRAITEMENT A LA DOPAMINE	60
FIGURE 37. MICROSCOPIE OPTIQUE DE STENTS NUS EN COBALT CHROME ET APRES TRAITEMENT A LA DOPAMINE,	61
FIGURE 38. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UN STENT EN COBALT CHROME FONCTIONNALISE (3 ETAPES).	62
FIGURE 39. COMPOSITIONS CHIMIQUE DU PTFE ET DU PU, AUX CARACTERISTIQUES HYDROPHOBES.	63
FIGURE 40. MICROSCOPIE OPTIQUE X 300 DE LA JONCTION D'UN SEGMENT DE PTFE TRAITE A LA PDA.	63
FIGURE 41. ASPECT MICROSCOPIQUE DE STENTS RUDIMENTAIRES CoCr + PTFE AVANT ET APRES TRAITEMENT A LA DOPAMINE.	64
FIGURE 42. ASPECT MICROSCOPIQUE (VHX) DES FACES LUMINALES ET ABLUMINALES DU REVETEMENT EN PTFE APRES DIP-COATING DURANT 22H.	65

FIGURE 43. ASPECT MICROSCOPIQUE (VHX) DE LA COUCHE DE PTFE DE STENTS RUDIMENTAIRES APRES 22H DE DIP COATING.....	65
FIGURE 44. ASPECT MICROSCOPIQUE (VHX) DE L'ARMATURE CoCr DES STENTS RUDIMENTAIRES APRES 22H DE DIP COATING.....	66
FIGURE 45. SCHEMA EXPERIMENTAL DU COATING SOUS FLUX A LA DOPAMINE DE STENTS PLACES EN SERIE.....	66
FIGURE 46. ASPECT DE LA FACE LUMINALE DU PTFE DE STENTS RUDIMENTAIRES FONCTIONNALISES A LA DOPAMINE EN MICROSCOPIE VHX.....	67
FIGURE 47. COMPOSANTS DU STENT PAPYRUS PK.....	67
FIGURE 48. ASPECT MICROSCOPIQUE DES FACES LUMINALES ET ABLUMINALE D'UN STENT PK PAPYRUS APRES FLUX BIDIRECTIONNEL DE PDA A 2 MG/ML PENDANT 18H.....	68
FIGURE 49. ASPECT EN MEB DE STENTS PAPYRUS PK NU ET FONCTIONNALISES A LA DOPAMINE EN GROSSISSEMENTS X 25 (HAUT) ET X 2500 (BAS).....	69
FIGURE 50. ASPECT EN MEB DE STENTS PAPYRUS PK NU ET FONCTIONNALISES A LA DOPAMINE EN GROSSISSEMENTS X 2500 (HAUT) ET X 5000 (BAS).....	70
FIGURE 51. ASPECT EN MEB DE LA FACE LUMINALE DE STENTS PAPYRUS PK NU ET FONCTIONNALISE A LA DOPAMINE EN GROSSISSEMENTS X 10 000.....	70
FIGURE 52. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU PEPTIDE 1072 MIMANT LE DOMAINE IGL1A DU CD31.....	71
FIGURE 53. SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'IMPLANTATION DE FLOW-DIVERTERS NUS OU FONCTIONNALISES AVEC LE PEPTIDE SP1072	73
FIGURE 54. ASPECT EN MEB A J + 7 APRES IMPLANTATION DE FD NU ET FONCTIONNALISE AVEC LE PEPTIDE 1072 DANS L'AORTE ABDOMINALE SAIN DE LAPIN.....	75
FIGURE 55 ASPECT EN MEB A J + 30 APRES IMPLANTATION DE FD NU ET FONCTIONNALISE AVEC LE PEPTIDE 1072 DANS L'AORTE ABDOMINALE SAIN DE LAPIN.....	75
FIGURE 56. ASPECT EN MEB A J + 60 APRES IMPLANTATION DE FD NU ET FONCTIONNALISE AVEC LE PEPTIDE 1072 DANS L'AORTE ABDOMINALE SAIN DE LAPIN.....	76
FIGURE 57. COUPES HISTOLOGIQUES TRANSVERSALES D'AORTE ABDOMINALE SOUS-RENALE DE LAPIN APRES IMPLANTATION DE FLOW-DIVERTERS FONCTIONNALISES AU 1072 OU NON (x 5).....	77
FIGURE 58. COUPES HISTOLOGIQUES TRANSVERSALES D'AORTE ABDOMINALE SOUS-RENALE DE LAPIN APRES IMPLANTATION DE FLOW-DIVERTERS FONCTIONNALISES AU 1072 OU NON (x 10).....	77
FIGURE 59 COUPES HISTOLOGIQUES TRANSVERSALES D'AORTE ABDOMINALE SOUS-RENALE DE LAPIN APRES IMPLANTATION DE FLOW-DIVERTERS FONCTIONNALISES AU 1072 OU NU (x20).....	77
FIGURE 60. ARTERIOGRAPHIES SERIEES.....	79
FIGURE 61. COUPES AXIALES DE FLOW-DIVERTERS PLACES AU SEIN D'ANEVRYSMES SACCIFORMES DE LA CCDT A J+7 (COLORATION HES).....	80
FIGURE 62. FLOW-CHART DE L'IMPLANTATION DE STENTS CoCr IN VIVO.....	851
FIGURE 63. ANALYSE EN MEB DE COUPES LONGITUDINALES ARTERIELLES CONTENANT DES STENTS EN CoCr A J+7 A DIFFERENTS GROSSISSEMENTS.....	854
FIGURE 64. ANALYSE HISTOLOGIQUE (HES) DE STENTS EN CoCr A J+7	84
FIGURE 65. ANALYSE EN MEB DE COUPES LONGITUDINALES ARTERIELLES CONTENANT DES STENTS EN CoCr A J+14 A DIFFERENTS GROSSISSEMENTS	85
FIGURE 66. ANALYSE HISTOLOGIQUE (HES) DE STENTS EN CoCr A J+14	85
FIGURE 67. ANALYSE EN MEB DE COUPES LONGITUDINALES ARTERIELLES CONTENANT DES STENTS EN CoCr A J+30 A DIFFERENTS GROSSISSEMENTS	86
FIGURE 68. ANALYSE HISTOLOGIQUE (HES) DE STENTS EN CoCr A J+30	86
FIGURE 69. VUE D'ENSEMBLE DE POLYMERES UTILISES POUR FONCTIONNALISER DES DISPOSITIFS ENDOVASCULAIRES... 89	89
FIGURE 70. PRINCIPE DU DIP-COATING	92
FIGURE 71. POLYDOPAMINE.....	94
FIGURE 72. APPLICATIONS POTENTIELLES DE LA FONCTIONNALISATION DE SURFACE A L'AIDE DE PEPTIDES MIMETIQUES DU CD31.....	106

ABRÉVIATIONS

AAA : anévrisme de l'aorte abdominale
BMS : bare metal stent
CFD : cerebral flow-diverter
CoCr : Cobalt-Chrome
DBCO : di-benzo-cyclooctyne
DVB : Dégénérescence de valve biologique
EP : endoprothèse
EtOH : éthanol
EVAR : Endovascular aortic aneurysm repair
HAEC : Human Aortic Endothelial Cells
HES : Hématéine-Eosine-Safran
IF : immunofluorescence
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LPS : lipopolysaccharides
MALE : major adverse limb events
MEB : microscopie électronique à balayage
MFA : microscopie à force atomique
MMP : matrix metalloprotease
OR : open repair
PBS : phosphate-buffered saline
PDA : polydopamine
PEG : polyéthylène glycol
PFA : paraformaldéhyde
PNN : polynucléaires neutrophiles
PPACK : Phe-Pro- Arg-chlorométhylcétone
PPP : plasma pauvre en plaquettes
PTFE : polytétrafluoroéthylène
PU : polyurethane
RIS : resténose intra-stent
SH2 : Src homology 2
SFK: Src family kinases
SPI : syndrome post-implantatoire
TCR : T-cell receptor
TIRF : Total Intern Reflection Fluorescence
XPS : X-ray photoelectron spectroscopy

A. INTRODUCTION

I. DISPOSITIFS ENDOVASCULAIRES : FLOW-DIVERTERS, STENTS CORONAIRES ET STENTS PERIPHERIQUES

Le travail de cette thèse consiste en la conception d'un revêtement de surface innovant applicables aux dispositifs endovasculaires, promouvant leur biocompatibilité et leur intégration pacifique par le tissu artériel. Cette introduction situe brièvement la place des dispositifs utilisés en pratique clinique à l'étage cérébral, coronaire et des artères des membres inférieurs.

I.1. Flow diverters

Jusqu'à dans les années 2010, le traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens consistait en l'exclusion de ces derniers à l'aide de coils, plus ou moins assistés de ballons. Cependant, l'embolisation par coils était grevée de taux de récurrence de près de 20% (1) et des taux de réinterventions avoisinant les 10% (2). Ce sont les travaux préliminaires sur le chien de Wakhloo et al. dès 1994 (3) qui ont montré la faisabilité de l'exclusion endovasculaire à l'aide de stents non couverts à fines mailles auto-expansibles (nitinol) d'anévrismes carotidiens. L'analyse histologique de ces implants montrait la présence d'une néo-intima couvrant le collet anévrysmal, qui sera plus tard dénommé « parent remodeling » (4,5). Cette technique d'exclusion endovasculaire se propage, et le terme « flow-diverter » est introduit en 2004 par Lieber et al. (6). Ces dispositifs sont composés de plusieurs couches de cobalt-chrome (CoCr) ou de nitinol, à même de limiter le flux vers le sac anévrysmal en fonction de leur densité (7,8). Ces dispositifs font leur entrée sur le marché de la radiologie neuro-interventionnelle en 2007 (9). Il s'agit d'un tournant majeur dans le traitement des anévrismes intracrâniens, permettant une diminution voire une interruption du flux sanguin dans l'anévrysmal. Après les résultats encourageants de la 1^{re} génération de dispositifs appelés Pipeline Embolization Device (PED, Medtronic, Irvine, CA, USA) lancé en 2011, les dispositifs de 2nde génération (Pipeline Flex Embolization Device, PFED, Medtronic) ont fait leur preuve de supériorité et représente la majorité des dispositifs implantés à l'heure actuelle. Ces dispositifs sont constitués de 48 à 96 bandes enchevêtrées de platine-tungstène et de cobalt-chrome-nickel. Les résultats contemporains de ces dispositifs retrouvent une occlusion complète obtenue entre 76 et 81.5% des cas dans de larges méta-analyses (10,11). En d'autres termes, la néo-endothélialisation complète et précoce de la lumière des flow-diverters, clé du succès de ces dispositifs par la formation d'une barrière physique protectrice de la thrombose et des événements emboliques cérébraux (12), n'est pas obtenue de façon constante et pérenne en pratique clinique. Cette exclusion incomplète peut être expliquée par la morphologie des anévrismes (collet large), des phénomènes hémodynamiques et de mauvaises appositions (13). Cette exclusion inconstante des

anévrismes peut perpétuer l'activité biologique du thrombus anévrysmal alimenté en sang frais, et la croissance de l'anévrysme jusqu'à la rupture (14). Le second avantage d'obtenir une endothélialisation rapide est de pouvoir diminuer la durée de bi-antiagrégation plaquettaire qui est associée à une morbidité significative (15). Plusieurs voies de recherche se sont ainsi développées, portant sur le design des stents (couche mince de nitinol (16)), leur composition (flow-diverter biodégradables (17)), l'utilisation de polymères biocompatibles (18), leur fonctionnalisation avec des drogues (héparine-rosuvastatine (19)), phosphorylcholine (20)) ou des stratégies de captures de cellules progénitrices de cellules endothéliales (21). Ces stratégies restent pour le moment à l'état expérimental.

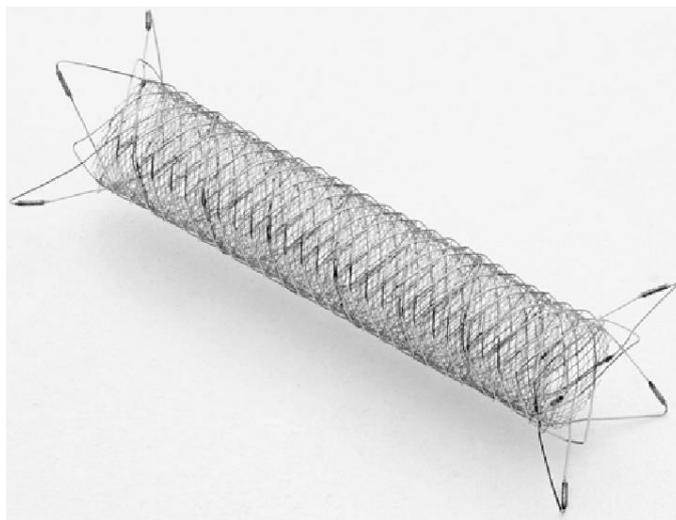


Figure 1 : Flow diverter de type FRED (flow Re-direction endoluminal device)

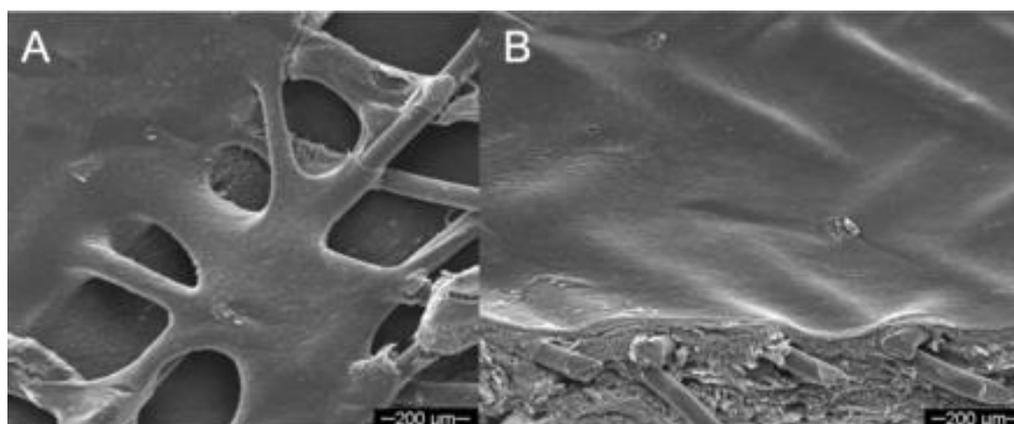


Figure 2 : Endothélialisation d'un flow-diverter.

A. Coupes en microscopie électronique à balayage d'un flow-diverter en voie d'endothélialisation en phase précoce après implantation. B. Après 1 mois, présence d'un néo-endothélium lisse et homogène recouvrant le métal (B). D'après (22)

I.2. Stents coronaires et périphériques

I.2.a. Stents non couverts

Le développement du stenting des artères périphériques a suivi celui des stents coronaires, implantés pour la 1^{ère} fois par Ulrich Sigwart et Jacques Puel en 1986 (23). C'est Palmaz qui implante en 1987 le premier stent (acier sur ballon) dans une artère iliaque (24). La première génération de stents était composée d'acier 316SS (Bare Metal Stent, BMS) contenant aussi du fer, du nickel, du chrome et du molybdène (25). L'acier a été choisi pour ses excellentes caractéristiques mécaniques et une bonne résistance à la corrosion. Son importante force radiaire, conférée par un module élastique important (propriété d'un matériau à être déformé) permet d'éviter le recoil (26). Toutefois, ces stents « ancestraux » présentaient le désavantage d'avoir un profil assez élevé en raison de la nécessité d'avoir une importante épaisseur de mailles pour obtenir une bonne visibilité. Pour augmenter leur radio-opacité, des tentatives d'ajout d'or ont été réalisées mais se sont avérées décevantes en termes de resténose et de mortalité à l'étage coronaire (27). L'utilisation ultérieure de CoCr a permis de s'affranchir des limitations de l'acier, en raison d'un module élastique, d'une force tensile et d'une densité supérieures. Par ailleurs, le CoCr possède des propriétés radio-opaques et une force radiaire supérieure à l'acier (25,28). Ces avantages ont permis la diminution de l'épaisseur des mailles tout en conservant une résistance à la déformation (25). Cette diminution de mailles permet une augmentation de la flexibilité, du diamètre interne du stent et diminue le risque de lésion artérielle lors de son implantation (26,29). La traduction clinique s'est illustrée avec une diminution de la resténose intra-stent (RIS) (30) et une amélioration du profil des dispositifs.

En plus de leur composition, la méthode de construction et la structure des stents impactent fortement leur profil, leur force radiaire et l'accès aux branches collatérales. Le design des stents a évolué depuis leur création, depuis le design dit stents « coils » puis « échanrés » (slotted stents) jusqu'au design actuel modulaire. Les stents coils, développés par Dotter en 1969 (31), étaient composés de bandes fines de nitinol spiroïdes. Ces stents flexibles présentent le principal inconvénient d'avoir une faible force radiaire et des taux de resténoses très importants (jusqu'à 54% à 1 an (29)). De plus, ces dispositifs ne permettaient pas de traiter des vaisseaux de moyen et petit calibre et ont été remplacés par les stents échanrés. Ces stents échanrés présentaient une plus grande force radiaire au prix d'une flexibilité moindre et d'un encombrement plus important (29). Le design des stents actuels est celui dit modulaire, c'est-à-dire la fusion de plusieurs modules et motifs répétés pour obtenir un stent tubulaire. Les stents actuels sont à cellules ouvertes.

Les stents peuvent être implantés de deux façons : sur ballonnet ou auto-expansibles. Le type de lésion artérielle détermine le choix du stent. La résistance à la compression externe, la conformabilité à des

tortuosités et la persistance d'une force radiaire après largage sont l'apanage du nitinol (32), fréquemment utilisé à l'étage fémoro-poplité. A l'inverse, des lésions sur artères moins mobiles ou nécessitant une force radiaire plus importante sont traitées à l'aide de stents en acier.

I.2.b. Résultats histologiques après implantation de stents nus

La principale lésion histologique après stenting est la constitution d'une néo-intima, se traduit cliniquement par la sténose intra-stent (33) retrouvée jusqu'à 40 % à 1 an et 60 % à 3 ans à l'étage fémoro-poplité pour les stents nus (34,35). Ces taux élevés de resténose dans cette localisation peuvent s'expliquer par les contraintes externes exercées sur l'artère fémorale superficielle (AFS, segment mobile), un remodeling négatif et par les caractéristiques histologiques de l'AFS, dense en cellules musculaires lisses (36). Cette sténose intra-stent, pouvant évoluer vers la thrombose, induit des taux de réinterventions et d'effets aderses de membre (MALE) majeurs (37). A l'étage coronaire, ces taux sont plus bas, avec des chiffres aux alentours de 15% à 1 an pour les stents nus et entre 2.5 et 4.9% pour les stents actifs (38).

On peut dissocier une phase initiale dans les 15 premiers jours après implantation, avec une agrégation plaquettaire avec des micro-thombis et un infiltrat leucocytaire (39,40), suivi d'une phase proliférative avec apparition de l'infiltrat des cellules musculaires lisses et de la matrice extra-cellulaire à partir d'un mois post-implantation (41). Scharz et al. soutiennent l'hypothèse que ces micro-thromboses initiaux pourraient servir d'architecture primordiale à la colonisation de cellules musculaires lisses activées (42). Cette hypothèse est intéressante, car elle lie lésion artérielle aigue (induite par le stent), et recrutement plaquettaire et d'érythrocytes sur site avec formation de thromboses, contenant des mitogènes attirant les cellules musculaires lisses. Ce concept de lésion artérielle n'est pas sans fondements, puisqu'il existe des phénomènes de lamination de la limitante élastique interne lors du déploiement de stents (39). Ces agrégats plaquettaires disparaissent avec le temps et laissent place aux lésions décrites ci-haut. Une des pistes d'amélioration de la biocompatibilité des stents pourrait passer par cette phase de recrutement plaquettaire initial, sorte de d'amarce au recrutement d'autres types cellulaires. Cependant, la formation de lésions de néo-intima malgré une mono ou une bi-anti-agrégation plaquettaire ne fait que souligner la connaissance imparfaite de ces mécanismes thrombotiques initiaux. A la phase chronique (> 1 mois), les rares études histologiques sur la réaction biologique vasculaire du tissu artériel après stenting retrouve une néo-intima constituée en majorité de matrice extra-cellulaire (à 90%, glycosaminoglycanes et de collagène) (42), de calcifications et de cellules musculaires lisses activées (de phénotype prolifératif), de macrophages (15%) et de leucocyte (10%). Il est à noter l'absence de cellules endothéliales (organisées en monocouche en conditions saines),

traduisant un défaut d'endothélialisation quasi-constant dans les études histologiques (33). A l'étage coronaire, la présence de débris macrophagiques et d'infiltrats lipidiques concourent à la formation d'une néo-plaque d'athérome. Ces lésions sont pourvoyeuses de rupture de plaque pouvant conduire à l'infarctus du myocarde (43). Des réactions à corps étranger de type granulome giganto-cellulaire ont également été décrites sur modèle animal (44). De façon intéressante, l'histologie et la formation de la néo-intima des stents nus diffère de celle des stents actifs : la densité des cellules musculaires lisses est plus importante pour les stents nus, avec un phénotype intermédiaire ou contractile dans les stents actifs, avec l'apparition d'une néo-intima plus tardive (> 1an) dans le cas d'implantation de stents actifs (45,46).

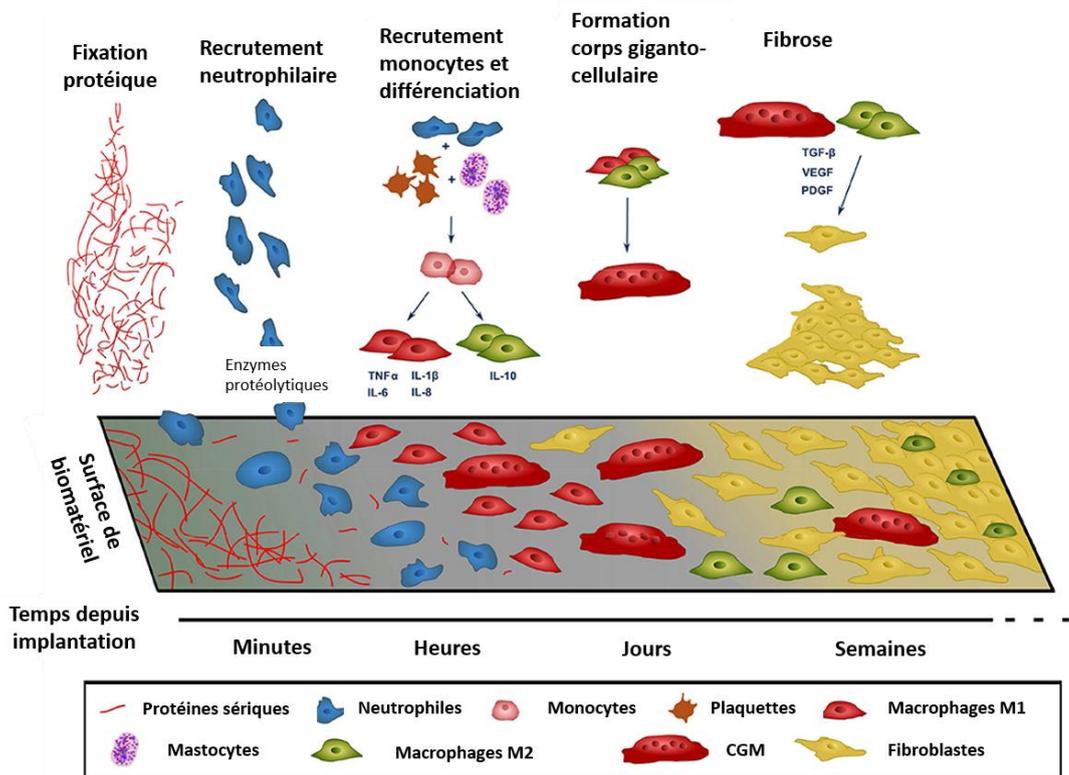


Figure 3: Schéma simplifié de la réaction à corps étranger généré par l'implantation d'un matériel endovasculaire (d'après (47))

I.3.c. Stents actifs

Bien que permettant d'éviter le recoil immédiat et de diminuer les taux de resténose par rapport à l'angioplastie au ballon seul, l'utilisation de stents acier était associée à de taux de resténose très importants (48) jusque dans les années 2000. Des modifications d'alliage métallique ou de structure n'ont pas permis de diminuer ces taux de RIS. Des stratégies d'amélioration se sont alors développées, comme la fonctionnalisation (revêtement) à l'héparine des stents coronaires qui a fait la preuve d'une diminution du risque de thrombose mais pas de RIS (49,50). Cette resténose, consécutive à une lésion de la paroi artérielle, est liée notamment à la prolifération de cellules musculaires lisses (30). Le blocage du cycle cellulaire par l'arrêt du cycle à l'étape G1/S (rapamycine) ou par la stabilisation des microtubules (paclitaxel) a été retenu comme cible pharmacologique (**Figure 4**) depuis les années 2000. Toutefois, ces drogues actives ont une durée de vie courte, incompatible avec un effet inhibiteur de la prolifération des cellules musculaires lisses à long terme. Leur effet doit être contrôlé et maintenu au cours du temps et c'est à l'aide d'un polymère que ce cahier des charges peut être rempli. Le polymère idéal doit être biocompatible, inerte avec le principe actif, permettre une libération contrôlée au cours du temps et présenter une stabilité chimique au cours du temps. Historiquement, le polyéthylène-co-vinyl-acetate (PEVA) et le poly-n-butyl-methacrylate étaient utilisés (stent Cypher) aux côtés du poly(styrene-b-isobutylène-b-styrene (stent Taxus). Toutefois, l'utilisation de polymères a été incriminée dans l'inflammation et la RIS (51), malgré le développement de composants plus « biocompatibles » comme le poly-vinylidène fluoride, l'hexofluoropropylène, et le polyvinyl-pyrrolidone (52). Pour éviter cet écueil, des polymères biodégradables ont été développés (53) bien qu'il n'existe pas de niveau de supériorité entre ces différentes stratégies (52).

L'utilisation des stents actifs en pathologie coronarienne a montré dans des essais randomisés contrôlés une diminution des réinterventions mais un taux identique de thrombose de stents et d'événements coronariens par rapport aux stents nus (54). Les essais comparant stents actifs au zotarolimus et sirolimus ne retrouvaient pas de différence significative (Etude TWENTE (55)) mais de larges méta-analyses retrouvaient de meilleurs résultats à long terme pour les stents en CoCr à everolimus (56).

La complication spécifique aux stents actifs est la thrombose dite « tardive » (« late and very late thrombosis »), soit à > 1 an après implantation, avec un désavantage pour le paclitaxel versus sirolimus (57). Cette thrombose tardive des stents actifs, plurifactorielle (58), peut être attribuée sur le plan histologique au défaut d'endothélialisation de la surface métallique du stent (59), exposant de façon plus prolongée la surface du dispositif au risque de thrombose. Ceci explique l'indication à une bi anti-agrégation plaquettaire prolongée (de 6 à 12 mois) après implantation de stents actifs. De façon intéressante, dans la large analyse de Palmerini et al, il n'existait plus de résultats significatifs au-delà

de 2 ans pour les stents actifs (56). Concernant la pathologie occlusive des membres inférieurs, plusieurs études randomisées retrouvent une différence significative en faveur des stents actifs au paclitaxel vs. nus en termes de perméabilité primaire, sans différence de mortalité (60,61). Ce dernier point reste toutefois un sujet grandement débattu, avec de nombreuses données émanant à la fois de méta-analyses robustes (62) ou de cohortes (63) ayant retrouvé une surmortalité significative chez les patients ayant reçu des dispositifs actifs au paclitaxel.

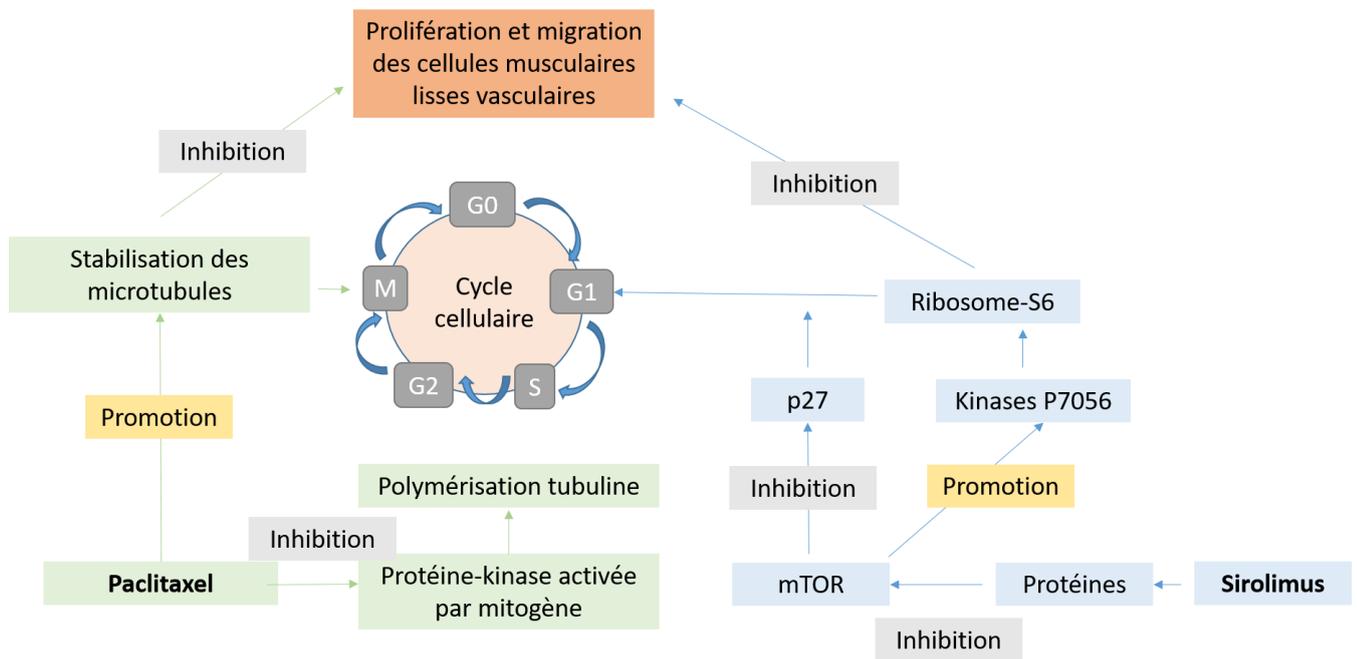


Figure 4: Voies d’actions du paclitaxel et du sirolimus sur le cycle cellulaire

I.3.d. Stents biorésorbables

Bien que l'utilisation de stents actifs en pathologie coronaire ou périphérique semble montrer des résultats intéressants en termes de réduction de risque de thrombose et de resténose, la perméabilité de ces dispositifs à long terme reste grevée par l'apparition tardive de sténose intra-stent. L'absence de données histologiques humaines sur la durée exacte d'élytion et d'efficacité biologique du principe actif, l'altération du tonus vasculaire (64) et la persistance d'un dispositif métallique dans le lit artériel sont autant d'arguments motivant le développement de dispositifs alternatifs comme les stents biorésorbables. Ces dispositifs ont en communs avec les stents actifs d'être constitués d'une structure tubulaire, d'un polymère et d'un principe actif. La structure biorésorbable est constituée elle-même d'un polymère ou d'un métal biodégradable. Sur cette plateforme, un second polymère est ajouté pour recevoir ensuite l'agent antiprolifératif. La structure tubulaire peut être composée d'acide poly-L-lactique (PLLA), de polycarbonate et/ou de magnésium (65). Ces polymères se dégradent au sein du lit artériel par hydrolyse où les composés sont détruits et rendus à l'état de pyruvate qui est internalisé via le cycle de Krebs pour produire du CO₂ et de l'eau. Le magnésium est quant à lui dégradé en hydroxyapatite, digéré par les macrophages (64,66). Ces stents biorésorbables doivent théoriquement avoir les mêmes caractéristiques que les stents métalliques mentionnés plus haut. Concernant les structures polymériques, leurs caractéristiques mécaniques sont intrinsèquement différentes et présentent un risque de fracture supérieur et un profil plus important, à cause de l'épaisseur de leurs mailles (64). L'utilisation de métal biorésorbable comme le magnésium permet d'obtenir une force radiaire supérieure à celle des polymères. Le seul dispositif commercialisé a été l'Absorb BVS (Abbott) mais a été retiré du marché en 2017 en raison de taux très importants de thrombose et de resténose (64). Cette stratégie innovante reste à l'état expérimental depuis lors.

I.3.e. Stents couverts

Les stents couverts pour traiter les artères de moyen et petit calibre ont suivi l'invention des endoprothèses (EP) aortiques couvertes. Après le développement de stents couverts rudimentaires pour traiter des complications hémorragiques, ces dispositifs couverts ont été utilisés dans le but d'isoler la face luminale du stent de la paroi aortique, avec l'espoir de limiter les phénomènes emboliques et de diminuer la RIS (67). L'utilisation de revêtements hydrophobes, comme le polytétrafluoroéthylène (PTFE) a été pensée pour limiter sa colonisation par les cellules circulantes du sang et en raison de son caractère électronégatif anti-thrombotique (68). L'étude histologique des stents couverts retrouvent une présence de micro-thrombus plus importante par rapport aux stents nus, composés de plaquettes, d'érythrocytes, de fibrine et de leucocytes (69,69). Des réactions à corps étranger de type géantocellulaires ont été observées au contact du PTFE, avec une inflammation adventitielle parfois associée à une néo-angiogenèse. Cependant l'inflammation semblait plus modérée que pour des stents nus (70).

L'endothélialisation n'était observée à partir du 6eme mois chez l'animal, avec une formation de néo-intima d'épaisseur variable dans les phases précoces après implantation (70–72). Toutefois, cette néo-intima augmente au cours du temps après 18 mois (68). Il semble que ce soit l'exposition au métal qui soit un facteur pronostic de prolifération néo-intimale chez l'animal (69,73). Les résultats se sont avérés décevants chez l'homme en pathologie coronarienne, avec des taux de thrombose plus importants que pour les stents nus, probablement en raison d'une endothélialisation imparfaite, exposant au risque de thrombose (74), reléguant ces stents aux situations d'urgence (perforation) ou aux anévrysmes coronaires.

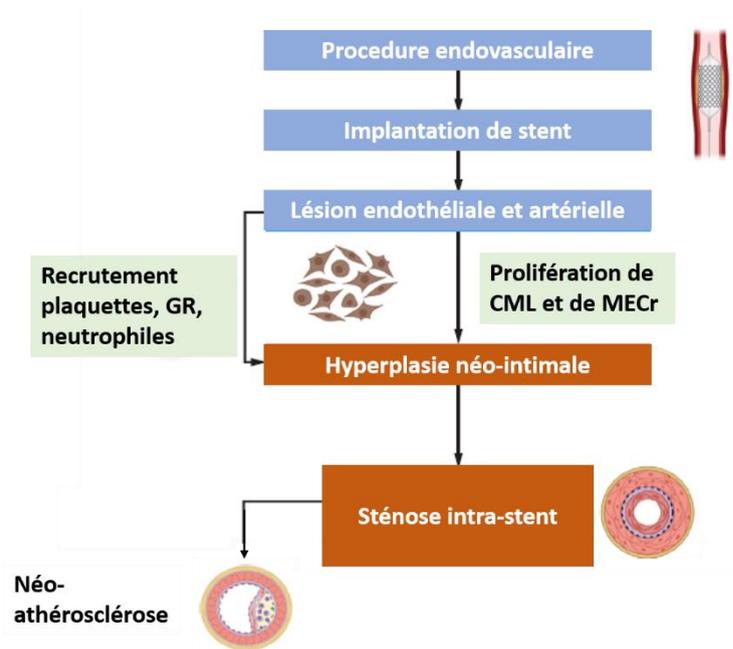


Figure 5. Physiopathologie simplifiée de la sténose intra-stent

I.3. f. Le stent « idéal » : Quelles caractéristiques ?

Le stent idéal doit avoir un profil d'introduction minimal, une résistance à la déformation (axiale et longitudinale) importante, une résistance à la fatigue majeure, l'absence de dégradation/corrosion, et une biocompatibilité satisfaisante. Cette biocompatibilité doit permettre l'absence d'interaction pathologique avec les cellules circulantes du sang (neutrophiles, plaquettes, érythrocytes) et donc l'absence de thrombose tout en permettant une intégration pacifique dans le tissu artériel sans rejet. La biocompatibilité doit être obtenue dans les faces abluminales (absence de lésion artérielle iatrogène) et luminale, avec une colonisation par des cellules endothéliales non activées (au phénotype non inflammatoire, anti-thrombotique) sans formation d'une néo-intima pouvant évoluer vers la sténose intra-stent.

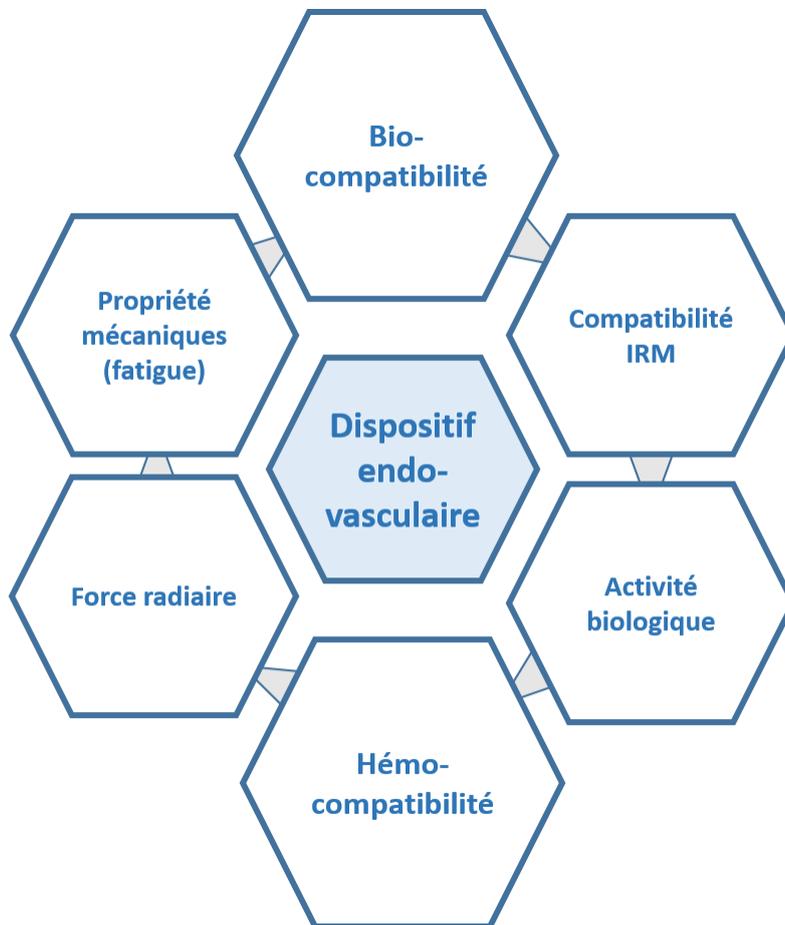


Figure 6. Caractéristiques recherchées pour le dispositif endovasculaire « idéal ».

II. CD31 ET PEPTIDES MIMETIQUES

II.1. Structure du CD31

Le CD31 est une glycoprotéine transmembranaire de 130 kDa (738 acides aminés) exprimée constitutivement et exclusivement par les plaquettes, leucocytes et cellules endothéliales (75–77), autrement dit par les éléments de l'interface sang-vaisseau. Le CD31 est constitué de six domaines extra-cellulaires Ig-like, d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique comportant deux immunorécepteurs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Historiquement, le CD31 a d'abord été classé dans la superfamille des IgCAM (Immunoglobulin Cell Adhesion molecule) en raison de son domaine extracellulaire Ig-like et appelé PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) et de son rôle supposé limité à l'adhésion entre plaquettes et cellules endothéliales (76). C'est la découverte de ses motifs ITIMs qui l'a ensuite classé dans la famille des Ig-ITIM (78). Ces motifs ITIMs conduisant des cascades de signalisation inhibitrices, le CD31 n'a plus été considéré comme une molécule d'adhésion depuis mais comme un récepteur immunorégulateur (79).

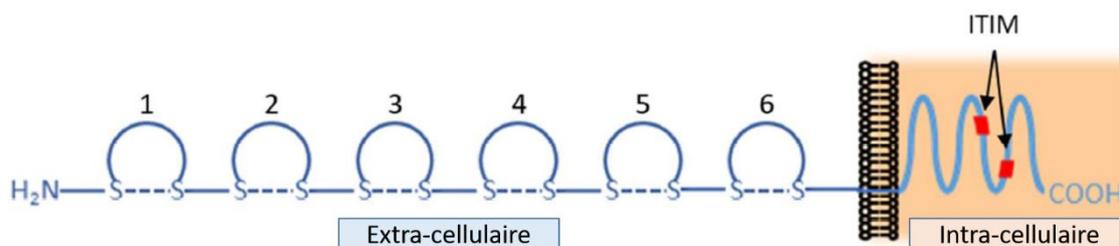


Figure 7. Schéma du CD31.

Les six boucles de la région extra-cellulaire représentent les domaines Ig-like, numérotés par ordre croissant depuis la distalité. Les tirets représentent les ponts disulfures stabilisant les différents domaines.

II.2. Fonctions cellulaires du CD31

Le CD31 est constitutivement exprimé à la surface des cellules endothéliales, des plaquettes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et mastocytes, soit l'intégralité des cellules hématopoïétiques à l'exception des hématies. Le niveau d'expression du CD31 dépend du type cellulaire: on en dénombre 5000 molécules par plaquette, 50 000 par lymphocyte T, 100 000 par neutrophile et 1 million par cellule endothéliale (76). Les effets régulateurs du CD31 diffèrent également selon le type cellulaire.

II.2.a. CD31 et plaquettes

Le CD31 joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire (80) : ses fonctions sont globalement inhibitrices; l'engagement du CD31 induit la phosphorylation des ITIMs et inhibe l'agrégation plaquettaire, la dégranulation des neutrophiles et la mobilisation intracellulaire du calcium dans les plaquettes activées *in vitro* (81,82). Les plaquettes de souris CD31 KO ont plus tendance à l'agrégation et la sécrétion de granules α que celles de souris WT, sous stimulation par collagène (83). Des études *in vitro* et *in vivo* ont également montré que l'engagement du CD31 inhibe la croissance du thrombus plaquettaire (81,84).

II.2.b. CD31 et leucocytes

Dans les lymphocytes T, l'interaction du CD31 et du TCR (T-cell receptor) inhibe l'activation TCR-dépendante (85). L'engagement du CD31 natif avec un CD31 recombinant diminue également la production de cytokines pro-inflammatoires et inhibe la prolifération des cellules T stimulées par le TCR (86). Dans les cellules B, la liaison récepteur B avec des chimères CD31 atténue les mécanismes d'aval comme la mobilisation de calcium (87). A l'inverse, les cellules B de souris CD31 KO montrent une tendance à augmenter la mobilisation de calcium et la prolifération après liaison du récepteur B (88). Le CD31 jouerait un rôle dans la migration et transmigration des polynucléaires neutrophiles (89,90). Des travaux récents dans notre unité U1148 LVTS ont souligné l'importance du CD31 dans la transmigration des polynucléaires neutrophiles, suggérant que la signalisation par le CD31 est essentielle pour contrôler la dégranulation aux sites d'inflammation. Le CD31 a également des fonctions inhibitrices dans les macrophages : son engagement régule négativement le signal du TLR-4 (toll-like receptor) et diminue la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés par le LPS (91). Le CD31 diminue également la phagocytose en transmettant des signaux dits de « détachement » entre une cellule saine et un macrophage attenant, à l'aide de son engagement homophile (92).

II.2.c. CD31 et cellules endothéliales

Le CD31 est localisé aux jonctions intercellulaires des cellules endothéliales à confluence (93). Il joue un rôle dans la formation de ces jonctions intercellulaires, le blocage du CD31 via des anticorps les inhibant (94). Cette participation aux jonctions intercellulaires se fait par l'engagement trans-homophile du CD31 décrit plus bas (95,96). Le CD31 a une place cruciale dans le maintien de la barrière vasculaire endothéliale en contrôlant la perméabilité cellulaire aux macromolécules (97). Il joue également un rôle dans la reconstitution de cette barrière après une brèche (98), comparable à un phénomène de cicatrisation au niveau cellulaire. De plus, la survie des cellules endothéliales dépendent d'une grande partie du CD31 (99–101). Le CD31 est également impliqué dans l'angiogenèse, et en particulier dans la promotion de la migration des cellules endothéliales (102,103). Enfin, le CD31 joue également un rôle de régulation dans l'extravasation des leucocytes à travers la membrane endothéliale (76,104,105).

Au total, le CD31 jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire : il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'activation leucocytaire et promeut la migration et la survie cellulaire; il permet également la formation et le maintien des jonctions intercellulaires responsables de l'intégrité de la barrière endothéliale. Ces caractéristiques, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires, sont des critères « idéaux » des dispositifs endovasculaires. A la lumière de ces informations, le développement d'un revêtement de dispositifs ayant les attributs du CD31 paraît intéressante.

II.3. Engagement physiologique et clivage du CD31

Les fonctions régulatrices du CD31 se font par le recrutement et l'activation de phosphatases par les ITIMs phosphorylées de sa queue cytoplasmique. Après phosphorylation de leur tyrosine centrale, les ITIMs deviennent un motif de liaison pour les domaines SH2 (Src homology 2) des tyrosine phosphatases (106). L'activation de ces ITIMs nécessite le regroupement par paire de CD31 et la présence de tyrosines kinases activées environnantes. Deux mécanismes sont à l'œuvre pour le regroupement du CD31 : une interaction trans-homophile impliquant les domaines distaux 1 et 2 (95,107) et un engagement cis-homophile du domaine 6 (96). Les deux ITIMs des deux molécules CD31 engagées sont alors phosphorylées par les tyrosines kinases. L'engagement du CD31 peut être consécutifs de plusieurs mécanismes comme l'agrégation plaquettaire (108), le stress pariétal (109), le stress oxydatif ou la liaison CD31-CD31 (110). Une fois phosphorylés, les ITIMs recrutent et activent les SHPs (SH2-containing phosphatases) et la SHP-2 en particulier (87,111). Les effets d'aval de l'activation des SHPs dépendent grandement du type cellulaire en question et du stimuli activateur reçu. Comme tous récepteur ITIM, le CD31 régule négativement les voies activatrices des récepteurs ITAM

(Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif), augmentant donc le seuil d'activation des cellules immunitaires (112). De façon plus prosaïque, le CD31 agit comme un « frein à main » immunitaire.

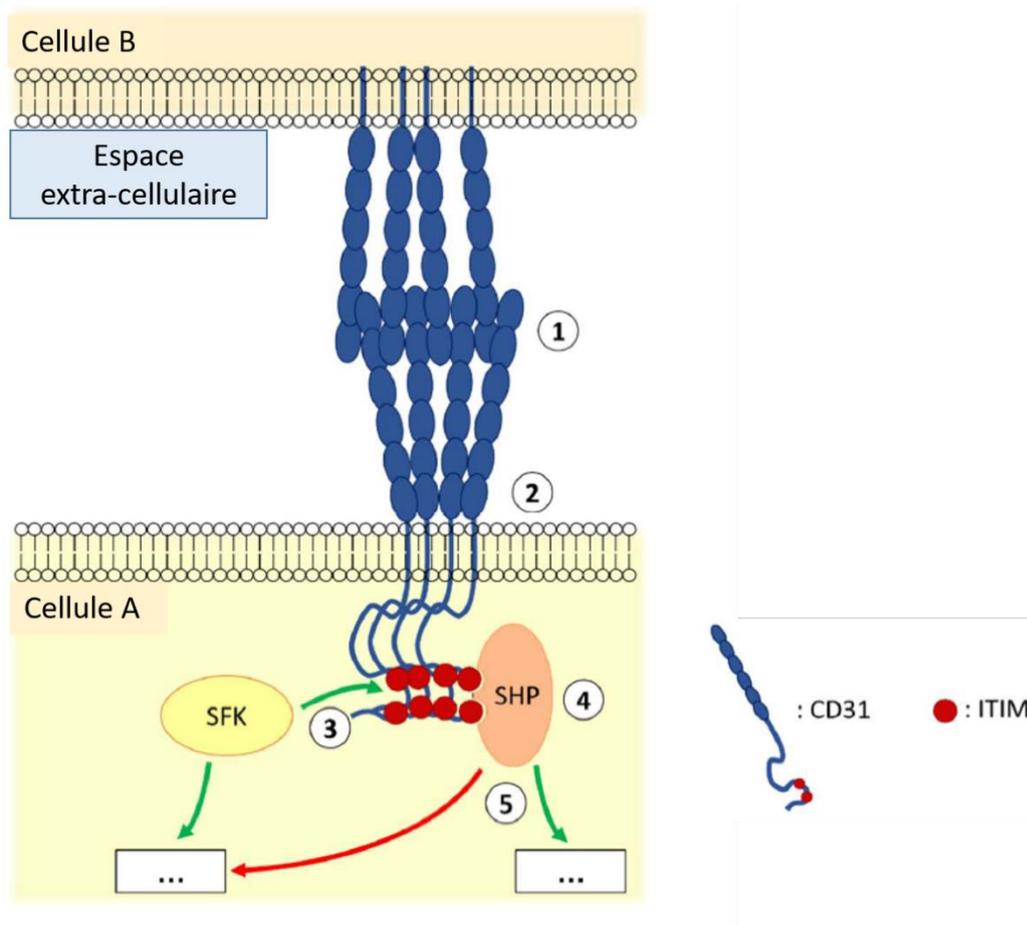


Figure 8. Activation du CD31 et signalisation.

1-Engagement trans-homophile des domaines les plus distaux de la membrane (1 et 2). 2- Consolidation du cluster par l'engagement cis-homophile du domaine le plus proximal. 3-Phosphorylation des domaines ITIMs par les kinases SFK (Src family kinases). 4-Recrutement et activation des SHP (SH2-containing phosphatases). 5-Inhibition des voies de signalisation dépendantes des SFK et activation des cascades de signalisation dépendantes des SHP.

Clivage du CD31. Sous l'effet d'activation cellulaire ou de conditions de stress, le CD31 peut subir un clivage dans sa portion extracellulaire dans différents types cellulaires. Dans les cellules endothéliales, le CD31 est clivé dans l'apoptose de restriction énergétique (113). Une protéine soluble de 100 kDas est alors émise lors de ce processus, correspondant au domaine extracellulaire du CD31. Une protéine tronquée, comprenant la partie cytoplasmique et les domaines transmembranaires du CD31, reste amarrée à la barrière plasmatique. Le CD31 est également clivé dans les plaquettes sous divers stimuli (inhibition de la calmoduline (114), leucocytes transfectés au VIH (115) ou lymphocytes T activés (116)). Les effets de ce clivage du CD31 comportent sans surprise la perte des fonctions régulatrices du CD31

(113,116), puisque l'engagement du CD31 nécessite son appariement trans-homophile, permis par les interactions entre les domaines distaux de la membrane, perdus avec le clivage (116). Les mécanismes moléculaires responsables du clivage du CD31 comprennent l'action de protéases, comme MMP-9 (117). Toutefois, plusieurs protéases sont susceptibles de cliver le CD31, les enzymes responsables variant significativement en fonction du type cellulaire et du monde d'activation. Dans tous les cas, le clivage du CD31 n'est pas complet (118) : il persiste en surface une partie « tronquée » comprenant notamment la partie cis-homophile du domaine juxta-membranaire. Il est donc possible de cibler les cellules CD31+ en train de s'activer via ce fragment qui reste exposé. Cette observation a ouvert la voie à des applications cliniques diagnostiques et thérapeutiques dans le domaine de la thrombo-inflammation puisque les plaquettes et les leucocytes activés, clivant donc leur CD31, se retrouvent concentrés à ces sites. Le clivage du CD31 est retrouvé dans de nombreuses pathologies du système immunitaire (polyarthrite rhumatoïde (119)) ou vasculaire (dissection aortique (116) et athérosclérose (120)). Dans des spécimens aortiques de dissection aortique chez l'Homme, le CD31 est absent à la surface des macrophages M1 pro-inflammatoires infiltrés dans le site de lésions récentes mais présent à la surface des macrophages M2 situés quant à eux dans des zones cicatricielles (121). Dans la pathologie anévrysmale chez l'Homme, une diminution des lymphocytes T CD31+ et un enrichissement de lymphocytes T CD4+/CD31- dans le sang et le tissu aortique pathologique ont été mis en évidence (120). Ces cellules contribuent à l'auto-entretien de la pathologie par la cytolysse des cellules musculaires lisses médiée par les lymphocytes T CD8+ et par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires activant à leur tour la protéolyse du mur aortique via les MMP2-MMP9 provenant de macrophages.

Les mécanismes de clivage du CD31 ne sont pas totalement élucidés, et comprennent notamment l'action de protéases responsables, comme MMP-9 (117). De façon intéressante, le clivage du CD31 extracellulaire n'est pas complet (118) : il persiste en surface une partie « tronquée » correspondant à une partie du domaine juxta-membranaire Ig-like 6, le reste de la partie transmembranaire et cytoplasmique restant intact. Cette observation ouvre la voie à une stratégie d'ingénierie peptidique en synthétisant des séquences mimétiques, permettant de cibler cette séquence peptidique restante avec l'objectif de restaurer les fonctions régulatrices du CD31.

II.4. Identification de peptides ciblant la portion cis- ou trans-homophile du CD31

II.4.a. Peptides ciblant la portion cis-homophile du CD31

Zehnder et al. ont démontré dès 1995 qu'un peptide synthétique (correspondant aux 23 résidus les plus proximaux clivés du CD31) permettait d'inhiber la prolifération lymphocytaire T de façon spécifique (122). Sur la base d'observation en microscopie TIRF, notre équipe a démontré que ce peptide agit via une homo-oligomérisation avec le CD31 des cellules au moment de leur activation (118). En criblant une large librairie de peptides autour de la séquence décrite par Zehnder, nous avons identifié une peptidomimétique de 8 acides aminés rétro-inversé (rotation dextrogyre pour limiter la dégradation enzymatique (123)), appelé P8RI, qui peut être utilisé comme traceur d'imagerie moléculaire spécifiques des sites d'inflammation (124). J'ai pu poursuivre mes travaux initié en Master 2 et faire la preuve de concept de l'utilisation de ce peptide en imagerie médicale pour évaluer le degré d'inflammation au niveau d'anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) chez le rat (125, **Annexe II**).

De plus, à plus forte concentration, ce peptide été aussi apte à stabiliser les clusters de CD31 malgré son clivage à la surface des leucocytes et limiter la réaction inflammatoire locale, dans les artères siège de complications athérothrombotiques (121). Puisque l'inflammation est source de complications aussi aux sites d'implantations des dispositifs médicaux endovasculaires, nous avons alors envisagé une application thérapeutique locale pour ce même peptide, pour limiter l'activation des plaquettes et des leucocytes ayant clivé le CD31 en s'activant au contact avec la surface des stents. Cette approche a démontré des effets thrombo- et immuno-régulateurs très encourageants *in vitro* et des résultats très prometteurs dans des études pré-cliniques *in vivo* (126)(127). Le recouvrement de la surface métallique avec le peptide issu de la portion cis-homophile du CD31, préservé du clivage, a efficacement atténué l'activation des leucocytes et des plaquettes au contact avec la surface *in vitro*, et cela s'est traduit par une endothélialisation efficace et une intégration facilitée des stents en CoCr et en nitinol dans la paroi artérielle. Cependant, lorsque *in vitro* les surfaces étaient confrontées à des cellules endothéliales au repos, les avantages spécifiques fournis par le revêtement avec le peptide cis-homophile semblaient relativement limités par rapport aux surfaces recouvertes avec les molécules pro-adhésives non spécifiques utilisées pour fixer le peptide sur les dispositifs, telles que la polydopamine ou le polyéthylène glycol. Nous avons postulé que l'absence d'effet direct et spécifique sur les cellules endothéliales au repos découlait probablement du fait que la séquence cible du peptide cis-homophile était dissimulée, cachée par la très grande structure extracellulaire du CD31 intact (avec ses 6 domaines Ig-like extracellulaires), rendant improbable l'interaction entre le peptide lié à la surface et la séquence homotypique proche de la membrane sur les molécules du CD31 des cellules endothéliales.

L'utilisation d'un revêtement avec le peptide cis-homophile est pertinente dans des scénarii dans lesquels les cellules interagissant avec le dispositif sont principalement activées (comme le cas de segments athérosclérotiques traités par stenting (118,121)). Dans les cas de flow-diverters dans une artère cérébrale anévrysmale ou dans les zones d'amarrage en aval et en amont d'une lésion athéromateuse, les cellules CD31+ en contact avec la surface du dispositif sont majoritairement des cellules au repos (sang circulant et endothélium adjacent): la capacité de ce revêtement peptidique à interagir avec le segment homotypique des cellules qui entrent en contact avec le dispositif doit être relativement réduite. Ces considérations nous ont amené à envisager un revêtement mimétique de la portion distale du CD31, celle engagée dans les interactions trans-homophile et qui devrait donc interagir facilement avec le CD31 intact des cellules non activées du sang et de l'endothélium vasculaire.

II.4.b. Peptides ciblant la portion trans-homophile du CD31

L'introduction de dispositifs endovasculaires lors d'interventions artérielles percutanées perturbe (physiquement) les interactions moléculaires homéostatiques qui normalement ont lieu entre les plaquettes sanguines, les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires. La perturbation de ces interactions cellulaires déclenche une réponse thrombo-inflammatoire pathogène, conduisant au développement de complications potentiellement mortelles après la pose d'un dispositif endovasculaire, sur une période prolongée. Bien que les stents actifs (relarguant des médicaments antiprolifératifs et immunosuppresseurs) puissent atténuer les réponses inflammatoires et le développement de la néo-intima, ils entravent également la cicatrisation artérielle, nécessitant un traitement antiplaquettaire double et prolongé pour contrer le risque accru de thrombose (128).

Étant donné que les complications thrombotiques associées aux stents qui libèrent des médicaments surviennent en raison de l'effet cytotoxique de ces médicaments sur les cellules endothéliales qui ne peuvent pas recouvrir la surface du dispositif, l'endothélialisation des dispositifs endovasculaires est devenue un domaine de recherche appliquée très actif. Diverses stratégies ont été explorées pour favoriser l'adhérence des cellules endothéliales aux différents types d'implants comprenant l'application de surfaces revêtues d'agents capables de capturer les progéniteurs de cellules endothéliales ou le développement de surfaces biomimétiques inspirées par des supports bien connus des cellules endothéliales tels que la fibrine ou la matrice extracellulaire (129). Cependant, bien que ces stratégies favorisent efficacement l'adhérence des cellules endothéliales aux surfaces des dispositifs, leurs avantages attendus n'ont pas été réalisés, que ce soit pour les stents en CoCr dans les sténoses coronaires ou pour les déviateurs de flux dans le traitement des anévrysmes cérébraux.

De facto, cibler uniquement le mécanisme d'adhérence des cellules endothéliales pour augmenter la biocompatibilité des stents s'avère insuffisant. Une couverture rapide et complète des cellules

endothéliales est aisément obtenue sur les stents en métal nu mais le phénotype des cellules endothéliales qui poussent sur une surface métallique n'est pas physiologique: les stents « nus » sont rapidement endothélialisés mais induisent des réponses locales thrombo-inflammatoires chroniques persistantes, conduisant à une resténose rapide.

Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans l'exécution de fonctions physiologiques essentielles, notamment des processus anti-inflammatoires et antithrombotiques (130). Cependant, pour que ces cellules remplissent efficacement leurs rôles, elles ont besoin de signaux appropriés et d'une très fine régulation. Le CD31, intact, joue un rôle central dans ce contexte (131).

Puisque l'interaction cellulaire CD31-CD31 au sein du système circulatoire repose principalement sur l'engagement de la portion trans-homophile au niveau des domaines 1 et 2 distaux de la membrane, on comprend que l'exposition substantielle de ces domaines sur le versant luminal de l'endothélium est indispensable pour le maintien de l'homéostasie : la possibilité d'engager le CD31 des plaquettes et des leucocytes circulants avec cette partie du CD31 à la surface des cellules endothéliales contribue de manière significative aux caractéristiques anti-inflammatoires et antithrombotiques de l'endothélium (131). De plus, l'inhibition de contact, la survie, l'imperméabilité de la barrière et la production de prostacycline PGI₂ sont toutes fonctions-dépendantes du contact CD31/CD31 des cellules endothéliales entre elles.

Guidés par ces réflexions, au cours de ma thèse, nous avons souhaité évaluer le potentiel d'une approche innovante qui implique de "camoufler" les stents et les déviateurs de flux par l'application de peptides imitant la portion trans-homophile des domaines 1 et 2 du CD31. L'hypothèse était que, en adoptant cette stratégie, les dispositifs peuvent être perçus comme des composants intégraux de l'endothélium sain par les cellules interagissant avec leurs surfaces, y compris les cellules endothéliales. Par rapport à la stratégie avec le P8RI, où le principe était de réduire la réaction des plaquettes et leucocytes activés, la stratégie actuelle consiste à masquer l'identité « étrangère » de ces dispositifs. En poursuivant cette stratégie, nous devrions observer une diminution des réactions locales indésirables sur le site d'implantation et une intégration plus harmonieuse et efficace des dispositifs au sein des artères traitées.

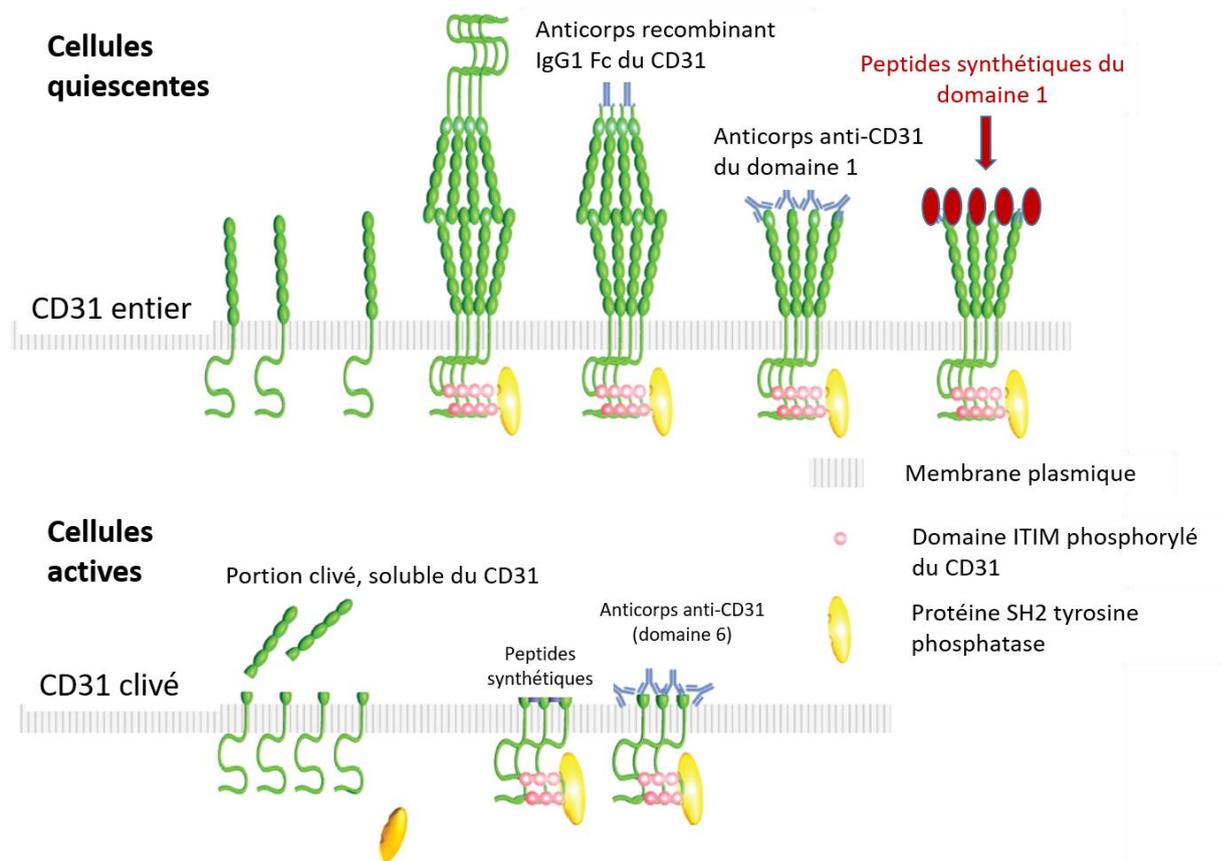


Figure 9. Considérations associées aux applications thérapeutiques du CD31

III. RATIONNEL DE LA THESE ET HYPOTHESES

Les dispositifs endovasculaires contemporains, qu'ils soient non fonctionnalisés ou actifs, induisent une réaction à corps étranger et sont grevés de taux significatifs de RIS (via la prolifération néo-intimale) et de thrombose, témoignant d'une intégration imparfaite au tissu artériel dans lequel ils sont implantés. Il est particulièrement important de souligner que les drogues des stents actifs contemporains restent cantonnées aux deux familles des « Taxol » et des « Limus », à effet cytotoxique sans pouvoir discriminant. En pratique, les dispositifs actifs retardent la formation de la néo-intima mais ne l'empêche pas, et ne font pas preuve d'une biocompatibilité optimale.

Nous proposons de développer une voie alterne, permettant aux dispositifs de s'intégrer pacifiquement dans le tissu artériel à l'aide de peptides mimétiques des domaines 1 et 2 du CD31 greffés à leur surface, ces derniers leur conférant une ressemblance avec un endothélium sain pouvant transmettre le signal homéostatique du CD31 « naturel » à toutes les cellules entrant en contact avec eux. Nous soumettons l'hypothèse que cette stratégie pourrait permettre de masquer le dispositif dès son implantation mais aussi de favoriser la migration de cellules endothéliales au phénotype sain, constituant un endothélium recouvrant l'intégralité du matériel étranger implanté, permettant son intégration pacifique et l'excluant de tout contact avec le sang circulant. Cette stratégie de « camouflage » biomimétique se traduirait par une réduction du besoin de libération locale de drogue immunosuppressives et antiprolifératives et pourrait permettre de se passer des traitements anti-thrombotiques systémiques, éliminant ainsi tous les effets adverses associés à leur usage chez les patients en postopératoire.

B. OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de notre projet de thèse de sciences étaient les suivants :

-Concevoir des séries de peptides capables de reproduire la plateforme d'interaction trans-homophile des domaines 1 et 2 du CD31

-Développer et valider une procédure adaptée pour reproduire, à la surface de composants de dispositifs endovasculaires, l'orientation adoptée par ces séquences du CD31 à la surface de l'endothélium sain, et ce indépendamment de leur nature ou composition.

-Identifier le peptide le plus approprié pour le revêtement des dispositifs endovasculaires, en se basant sur une évaluation fonctionnelle *in vitro* réalisée sur des disques plats en nitinol et cobalt-chrome, en prenant en compte prend des critères tels que l'hémolyse, la réaction de l'endothélium et les réponses des éléments sanguins au contact des surfaces fonctionnalisées.

-Transférer la procédure de revêtement avec le peptide choisi sur différents types de dispositifs endovasculaires et évaluer l'effet du revêtement *in vivo*, dans des modèles pré-cliniques adaptés.

C. TRAVAUX EXPERIMENTAUX

I. Conception et criblage des peptides mimétiques du CD31

I.1. Identification des séquences impliquées dans l'interaction trans-homophile du CD31

Afin d'obtenir des peptides mimétiques de la portion trans-homophile du CD31, nous nous sommes basés sur la caractérisation structurale des brins des domaines 1-2 du CD31 endothélial en interaction, informations obtenues par cristallisation. Des interactions cruciales interviennent à l'interface des domaines 1 (IgD1/IgD1) et 2 (IgD2/IgD2) et également entre le domaine 1 d'une molécule de CD31 et le domaine 2 d'une autre (contacts inter-domaines IgD1/IgD2), **Figures 10 et 11)**

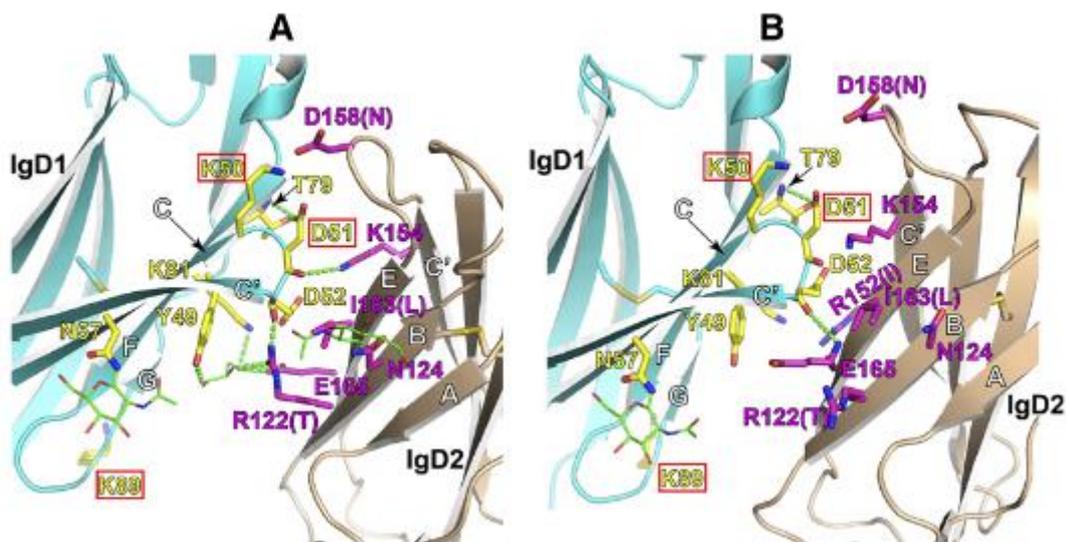


Figure 10. Interaction trans-homophile du CD31 d'après Paddock (107)

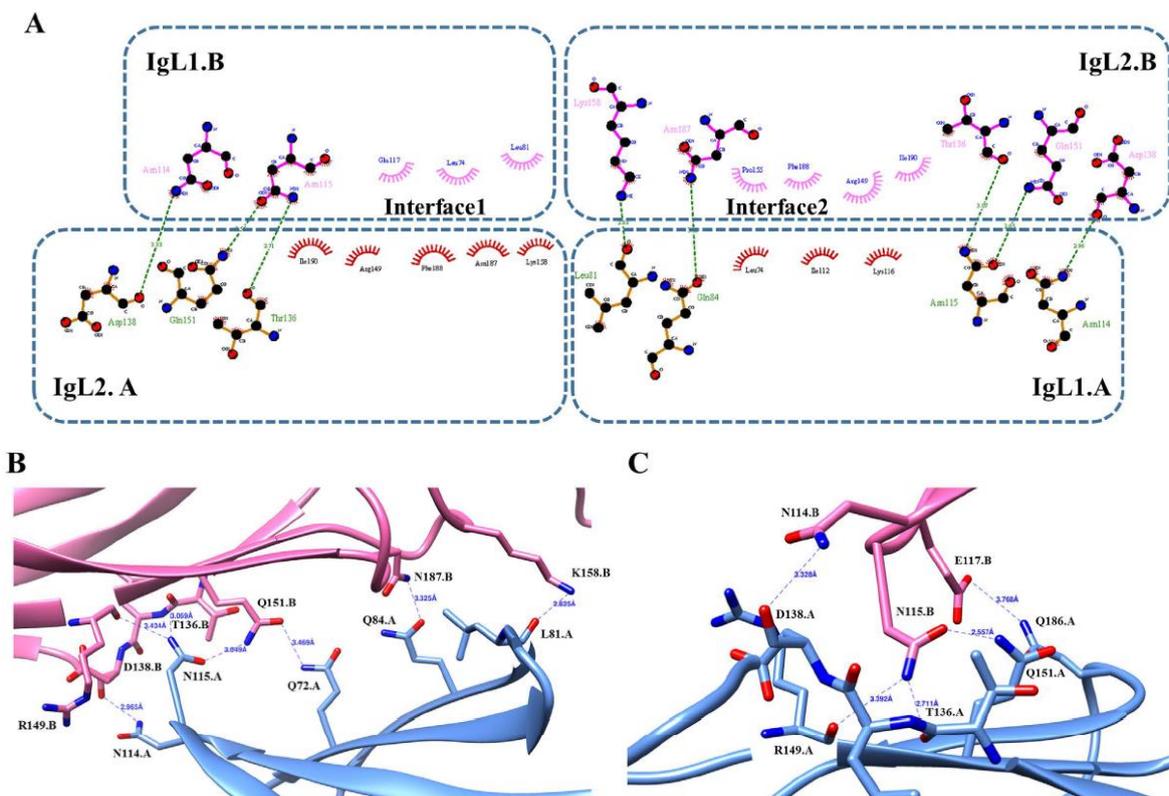


Figure 11. Interaction trans-homophile du CD31 selon Hu (132)

Les deux fragments IgL1-2 se lient dans une disposition antiparallèle face-à-face. Deux surfaces d'interaction existent, la première entre le sous-domaine IgL1 de la chaîne A (IgL1-1A) et le sous-domaine IgL2 de la chaîne B (IgL2-B) et la seconde entre le sous-domaine IgL2 de la chaîne A (IgL2-A) et le sous-domaine IgL1 de la chaîne B (IgL1-B).

Plusieurs peptides (≈ 20 résidus) ont été synthétisés à partir des séquences comprenant les acides aminés clés issus des recherches de Paddock et Hu (107,132). Les différents peptides ont été classés en quatre groupes selon leur design: Groupe I, Groupe II, Groupe III et Groupe IV a/b. Les peptides du Groupe I ont été conçus pour mimer la région du CD31 humain IgL1 couvrant les séquences His71-Ser87 ou Gln70-Lys89. Des homocystéines Gln70hCys et Met88hCys ont été incorporées pour former des ponts disulfures et permettre une séquence cyclique. Une séquence commune QHXXLFYKDDXXFYNISSXX a été déclinée en plusieurs variants. Les peptides suivants ont été inclus dans le Groupe I : SP722, SP745, SP765, SP1374 et SP1375.

Les peptides du Groupe II ont été conçus pour mimer la région du CD31 humain IgL1 couvrant les séquences Tyr107-Glu122 ou 106-24aa. Des homocystéines 106hCys et 124hCys ont permis d'obtenir des structures cycliques. Une séquence commune KSTVIXNNKEKTTXE a été déclinée en plusieurs variants. Les peptides suivants ont été inclus dans le Groupe II : SP1072 et SP1376.

Les peptides du Groupe III ont été conçus pour mimer la région du CD31 humain IgL2 couvrant les séquences Pro133-Lys158. Les acides aminés Val135hCys et Cys152hCys ont été rajoutés pour obtenir là aussi des ponts disulfures et permettre une structure cyclique. Une séquence commune XCTLDKKEIXIQQGXVXVNCVPEEK a été déclinée en plusieurs variants. Les peptides suivants ont été inclus dans le Groupe II : SP1071 et SP1380.

Les peptides du Groupe IVa et IVb consistaient en des hétérodimères, combinant respectivement des peptides des Groupes I et II (peptide SP1379) et des Groupes I et III (peptide SP1383). Ces peptides ont été brevetés par l'équipe sous le numéro PCT/EP2022/084241.

Un exemple de chaque groupe (peptides SP1374 (Groupe I), SP1072 (Groupe II), SP1071 (Groupe III), SP1379 (Groupe IVa) et SP1383 (Groupe IVb) est illustré dans la **Figure 12**, et la séquence du CD31 ciblée est détaillée dans la **Table**.

Les séquences du CD31 comprises dans les peptides des cinq groupes ont toutes été implémentées avec l'adjonction d'acides aminés et autres réactifs utilisés pour les cycliser ou les allonger. Tous les peptides ont été produits sous forme de dérivé azide en N- ou C-terminal, afin de permettre la réaction de chimie-click dans l'orientation voulue sur le linker-DBCO fixé au support d'étude.

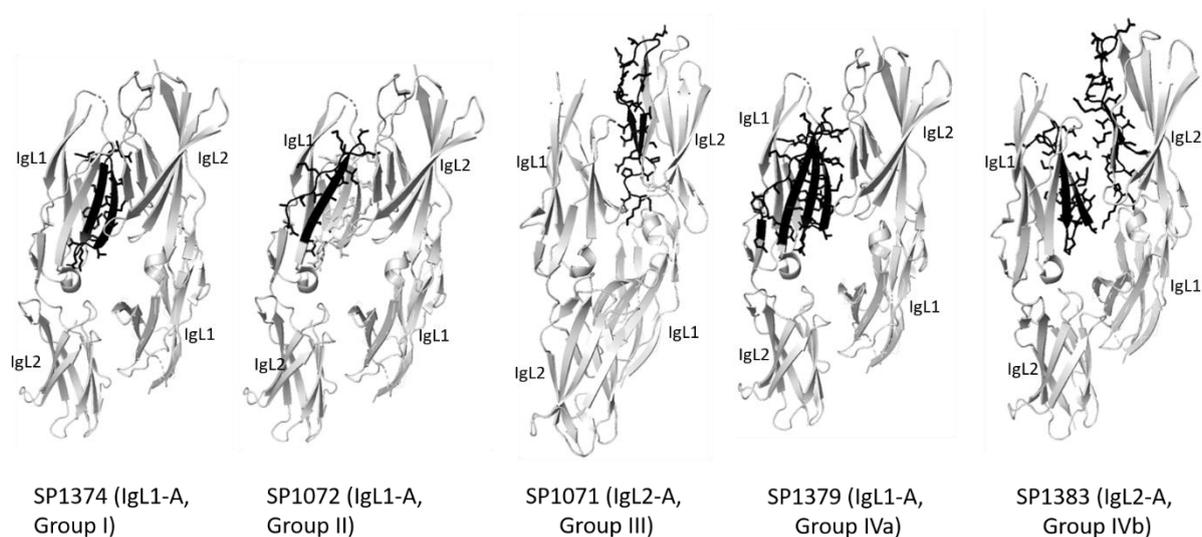


Figure 12. Peptides mimant le domaine 1/2 du CD31 (en noir) sélectionnés pour les études *in silico* et *in vitro*.

PEPTIDE (GROUPE)	REGION PROTEIQUE	Domaine du CD31 et Position de l'azide	SEQUENCE
SP1374 (I)	Gln70-Lys89	1, azide en C-terminal	QHQMIFYKDDVLFYNISSMK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-KN3 CONH2
SP1072 (II)	Tyr107-Glu122	1, azide en C-terminal	YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N3)-NH2
SP1071 (III)	Pro133-Lys158	2, azide en N-terminal	Ac-K(N3)-PEG4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEKCONH2
SP1379 (IV-A)	Thr106-Gln124 +Gln70-Lys89 (K8hC	1 (dimère, azide au milieu)	[-CH2CO*-GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)4-K(N3)-NH2]-[QHQMIFY-hC*-DDVLFYNISSMK-NH2]
SP1383 (IV-B)	Pro133-Lys158 + K8hCGln70-Lys89	1-2 (dimère, azide en N terminal)	[Ac-K(N3)-(Ttds)4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK Ttds-K(-CH2CO*)NH2]-[QHQMIFY-hC*-DDVLFYNISSMK-NH2]

Table : Détails des peptides présentés en Figure 12.

Tous les peptides furent synthétisés suivant des protocoles en phase solide utilisant l'ingénierie chimique Fmoc/t-Bu et du diméthylformamide comme solvant (IRBM, Italie). Des analyses tridimensionnelles ont permis d'estimer l'interaction du peptide avec sa cible et de trouver le meilleur compromis entre conformation tridimensionnelle et stabilité et de présélectionner des candidats au sein de chaque groupe (**Figure 13**).

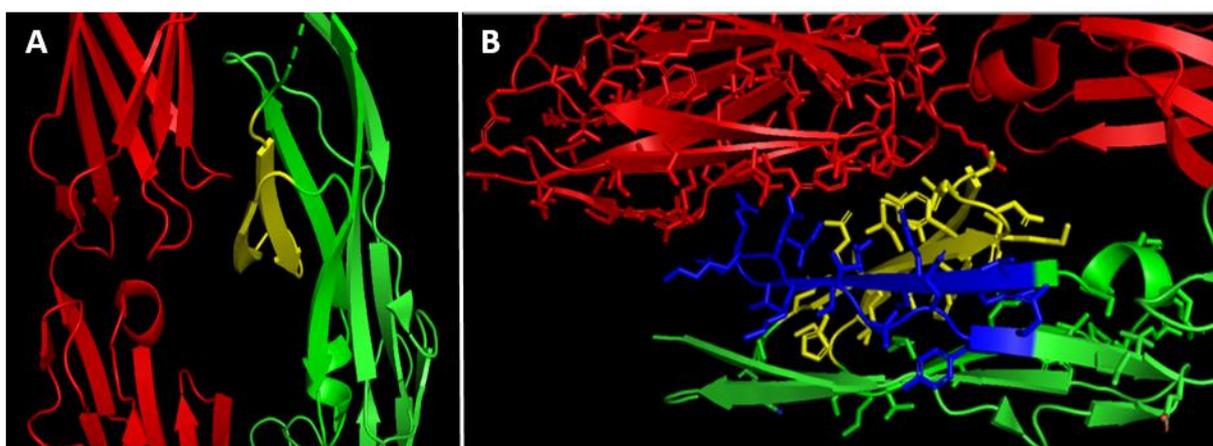


Figure 13. Modélisation tridimensionnelle des peptides 745 (A) et 1376 (B) au sein de la structure du CD31. En rouge et vert deux molécules de CD31 différentes. En jaune la séquence du peptide 745, en bleu celle du peptide 1376, au sein du domaine 1 de la molécule de CD31 en vert, les deux établissant des interactions anti parallèles avec le domaine 2 de la molécule de CD31 en rouge, d'après une modélisation de l'institut IRBM (Italie).

Leurs structures et leurs similitudes des peptides synthétisés par l'IRBM avec les protéines natives des séquences cibles du CD31 ont été évaluées par spectroscopie Raman (Belen Hernandez, INSERM U1148, **Figure 14**). Les peptides étaient dissous dans du tampon phosphate (pH 6.8) à une concentration de 5 mM et un flux laser Argon (488nm) était appliqué à 50 μ L des solutions de peptide puis capté par des cellules de quartz Suprasil (5 mm de trajet) permettant de recueillir le spectre Rama. Le flux lumineux était alors analysé par un spectrographe Jobin-Yvon T64000 (grillage holographique de 1200 stries/mm, seuil de 5 cm^{-1}).

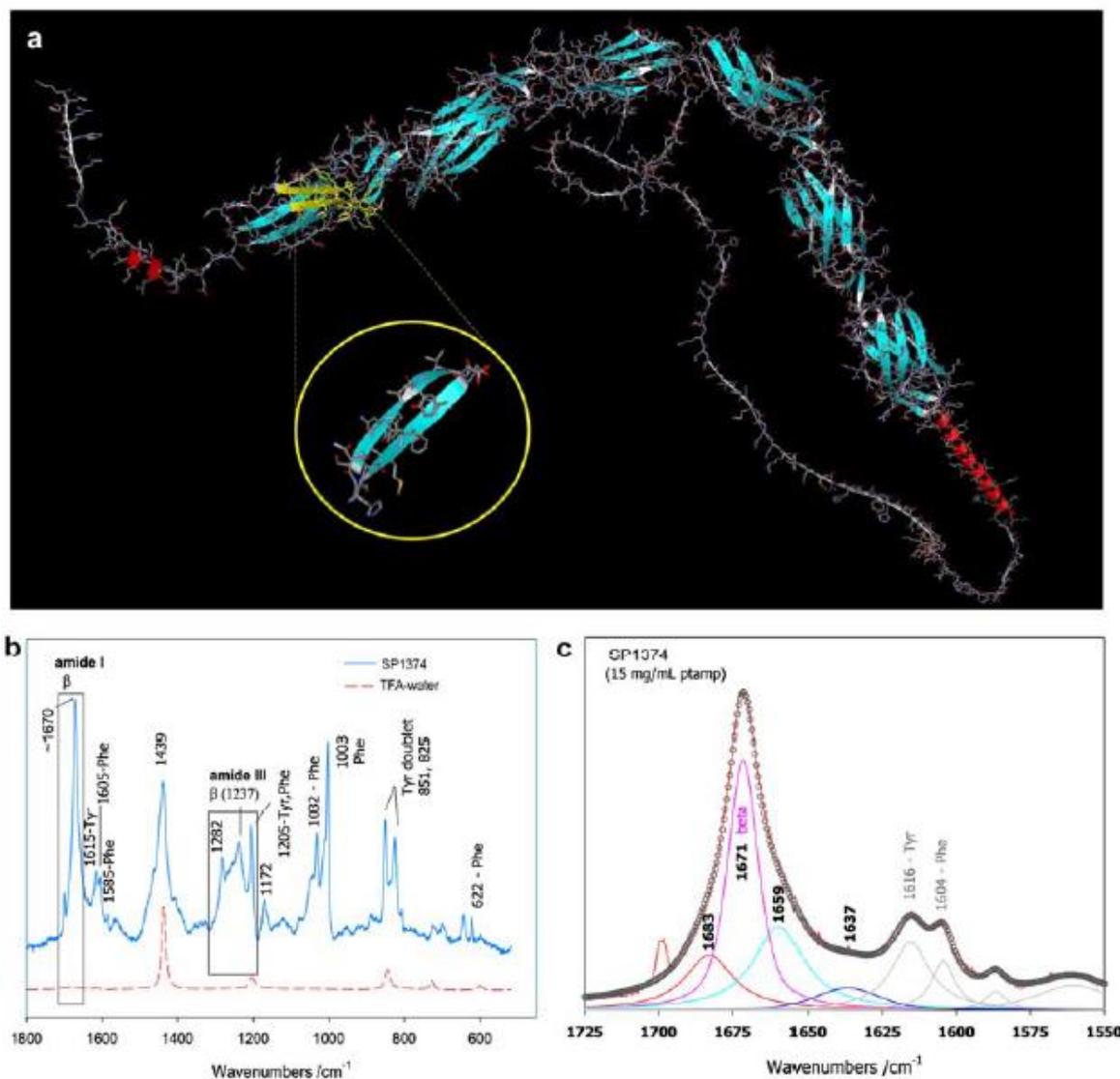


Figure 14. Modélisation tridimensionnelle du peptide 1374 et spectroscopie Raman.

- Conformation du peptide 1374 (en jaune) comparée à sa structure dans le modèle 3D du CD31.
- Spectre Rama d'une solution peptidique. Les régions d'analyse utilisées pour le diagnostic structurel (Amide I, III) sont marquées par des rectangles.
- Décomposition de la région Amide I du peptide SP1374, révélant une structure majoritairement composée de feuilletts β (à 45%). Les autres composants correspondent à des éléments de stabilité entre feuilletts β et à des éléments désorganisés en bout de chaîne.

Ainsi, les peptides SP1374 (Groupe I), SP1072 (Groupe II), SP1071 (Groupe III), SP1379 (Groupe IVa) et SP1383 (Groupe IVb) ont été sélectionnés pour les manipulations ultérieures (**Figure 12, Table**). Ces cinq peptides ont tous subi une modification chimique avec adjonction d'un groupement -azide proximal, permettant la fixation ultérieure d'un linker.

I.2. Immobilisation des peptides candidats par « chimie-click » sur couche de polydopamine et caractérisation du revêtement *in silico*

Dans la continuité des travaux de l'unité dont le travail de thèse de Charlotte Rasser, l'option la plus efficace et permettant la meilleure conformabilité des peptides d'intérêt retenue a été l'immobilisation du peptide agoniste par « chimie-click » avec un revêtement à base de polydopamine en utilisant un linker bi-orthogonal à triple liaison (**Figure 15**).

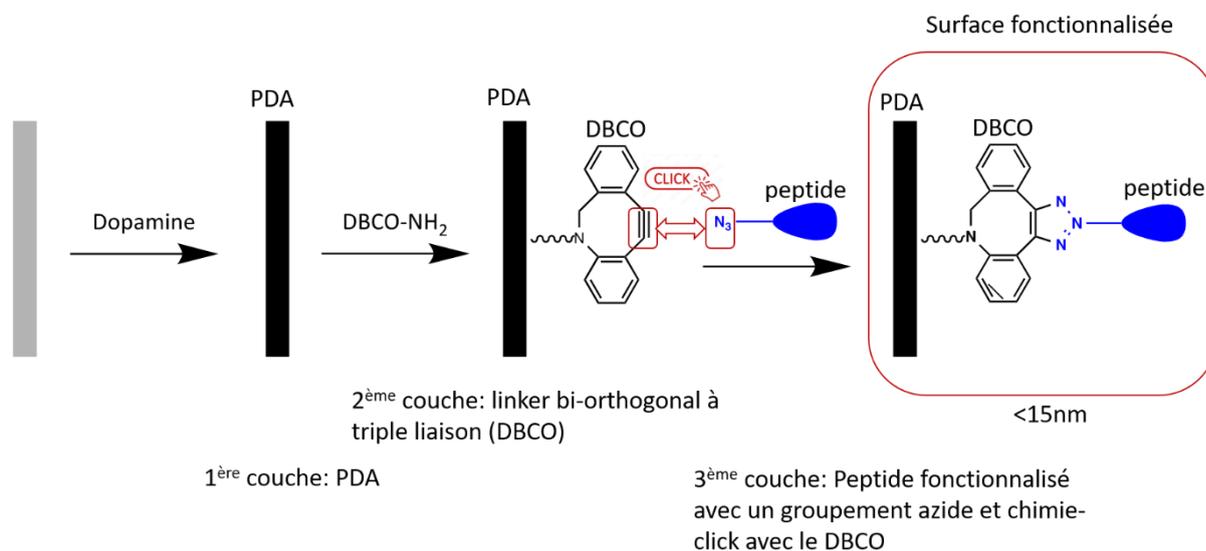


Figure 15. Stratégie de fonctionnalisation de surface

Cette stratégie comporte trois étapes successives d'immersion (« dip-coating ») avec un premier bain de polydopamine, suivi de celui du linker qui permettra une liaison forte avec le groupement azide (liaison alkyle-azide) du peptide d'intérêt selon le principe de chimie-click (« click-chemistry »). Ce principe a révolutionné la synthèse de molécules « drug-like » et a été décrit par Barry Sharpless en 2001 (133), récent lauréat du prix Nobel de chimie en 2022.

Nos premières expériences *in vitro* ont été réalisées sur des disques polis de 6 mm de diamètre de nitinol et de Cobalt Chrome L-605, alliages retrouvés dans les dispositifs endovasculaires cliniques. Les disques de nitinol (Goodfellow Cambridge Ltd) et de CoCr (Goodfellow Cambridge Ltd) étaient

nettoyés par ultrasons dans trois bains successifs de 10 minutes d'acétone, d'éthanol absolu et d'eau distillée afin d'enlever tout résidu organique. Après un lavage abondant à l'eau distillée, les pastilles étaient conservées dans une solution tampon de Tris-HCl à pH basique. Toutes les manipulations suivantes ont été réalisées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

Auto-polymérisation de la polydopamine : Le protocole de dip-coating à la dopamine a été adapté par le travail de Lee et al (134). Une solution de dopamine à 2mg/ml à partir d'un lyophilisat d'hydrochlorite de dopamine (Alfa Aesar A11136) dissous dans une solution aqueuse tampon de Tris-HCl à 10mM (pH = 8.5) était préparée immédiatement avant les manipulations. Les pastilles sont disposées dans une plaque 48 puits à fond plat contenant 200µL de la solution de dopamine par puits. La plaque est ensuite mise à agiter à 400 rpm pendant 20h +/- 2h. Selon Lee et al., cette auto-polymérisation de dopamine crée un revêtement homogène et lisse d'approximativement 45nm d'épaisseur (134). Après ce bain de dopamine, les échantillons (disques) étaient rincés abondamment à l'eau distillée puis placés dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes afin d'éliminer les agrégats de polydopamine puis transférés dans une nouvelle plaque 48 puits contenant 200 µL d'eau distillé.

L'évaluation quantitative du revêtement à la PDA a été réalisée par analyse de spectrométrie photo-électronique (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS). Brièvement, les spectres XPS des surfaces non traitées (nues) et traitées par bain de polydopamine (PDA) ont été détectés l'aide d'un spectromètre PHI 5600-CI (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) sur trois points par surface (diamètre de surface étudiée de 500 µm, profondeur de champ 8 nm) pour s'assurer de l'homogénéité du revêtement (200 W, 10 kV, angle de détection : 45°).

Les résultats (**Figures 16 et 17**) confirment la présence du revêtement de dopamine confirmé par l'augmentation des teneurs en carbone, azote ainsi que la disparition des pics correspondants à d'autres éléments métalliques : le Nickel (Ni) et le Titane (Ti) dans le cas du nitinol ; et le cobalt (Co), le chrome (Cr) le tungstène (W) et le nickel (Ni) dans le cas des disques en CoCr (alliage L605).

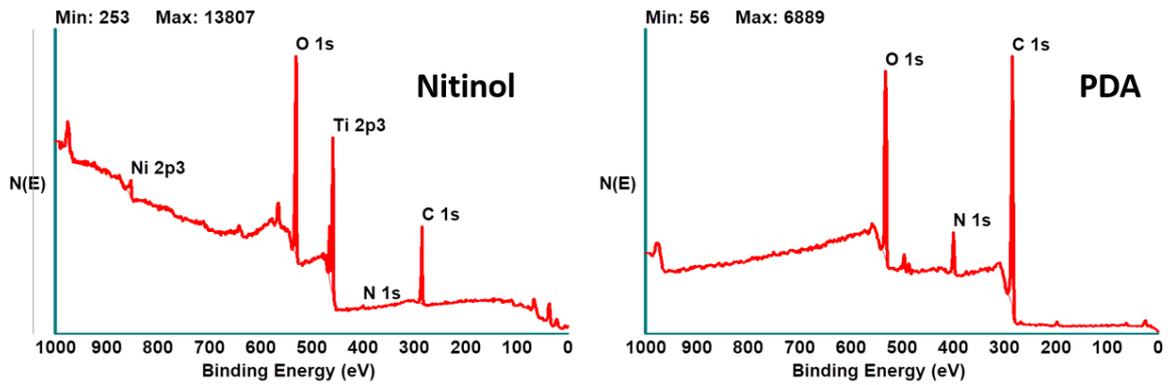


Figure 16. Analyse XPS de surface de nitinol nu et fonctionnalisé à la PDA

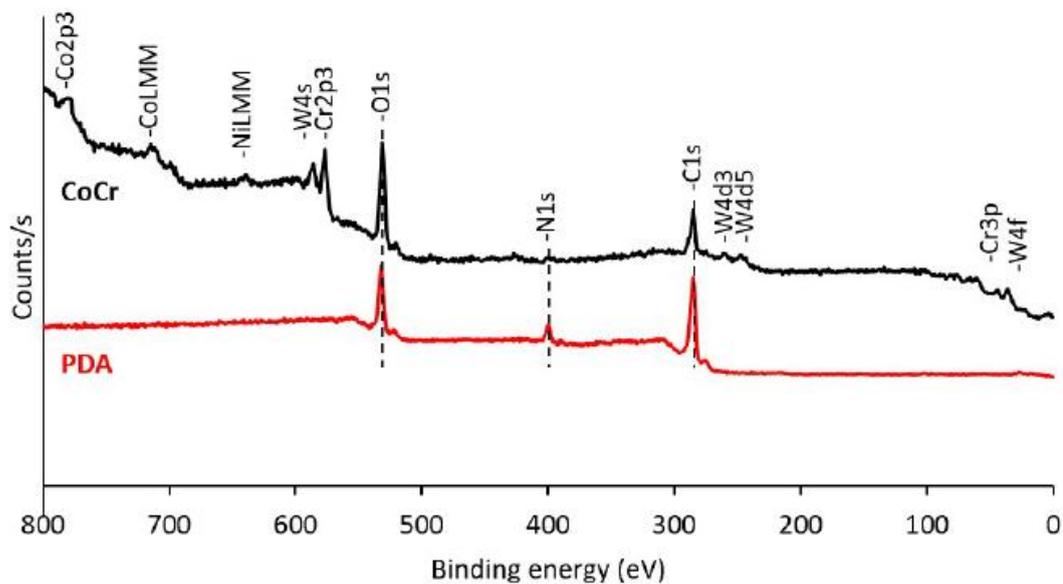


Figure 17. Analyse XPS de surface de Cobalt-Chrome nu et fonctionnalisé à la PDA (selon Rasser).

Immobilisation du peptide mimétique à l'aide d'un linker

L'utilisation d'un linker a été décidée afin de permettre une meilleure conformation tridimensionnelle et une meilleure présentation des peptides d'intérêt à leur cible à la surface cellulaire. Le choix de celui-ci est primordial et joue l'intermédiaire entre la couche de polydopamine et le peptide mimant le domaine 1 et/ou 2 du CD31, ce dernier pouvant ne pas avoir la conformation optimale si greffé trop proche de la surface de l'alliage. Notre choix s'est donc porté sur un linker de longueur égale à 4 chaînes de polyéthylène glycol (PEG) permettant d'apporter de la flexibilité. Ce ligand permet ainsi 1-d'avoir une fonction amine à une extrémité pour interagir avec les fonctions o-quinone de la couche de polydopamine, 2-d'avoir une chaîne

flexible permettant l'accessibilité des peptides et 3-d'avoir à son autre extrémité une fonction spécifique (triple liaison) indispensable pour permettre à la réaction de « chimie click » d'avoir lieu avec la portion N-terminale des peptides. Les dernières avancées dans le domaine de la chimie click ont permis de mettre au point des réactions « biology friendly » ne nécessitant plus l'utilisation de cuivre (nécessitant un solvant organique) et pouvant être facilement mis au point en milieu aqueux et a pH neutre, nous amené à choisir un linker Amine-(PEG)₄-DBCO.

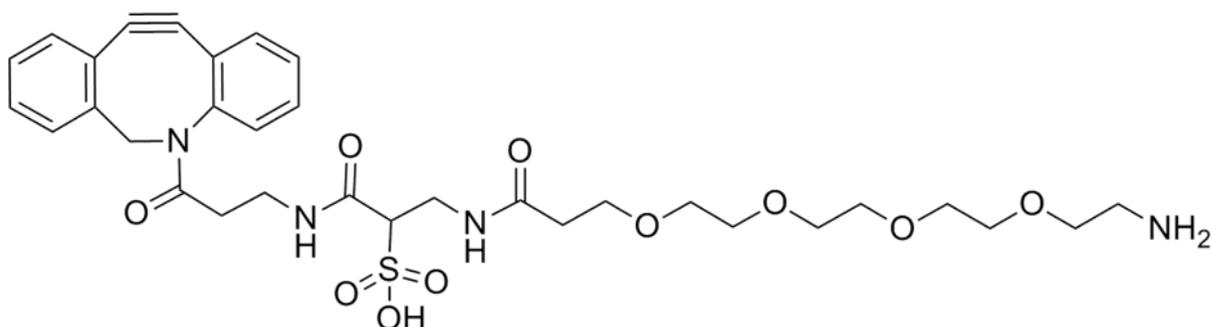


Figure 18. Structure du linker DBCO possédant à ses extrémités un groupement amine pour liaison à la PDA et un groupement alkyle pour lier le peptide

Cette deuxième étape du revêtement consistait en l'adjonction du linker di-benzo-cyclooctyne (DBCO) sur les disques de nitinol et de CoCr précédemment revêtus de dopamine. Cette procédure a lieu en condition stérile sous hotte à flux laminaire : une solution contenant 300 μ M (203 μ g/ml) de DBCO-amine (IRIS biotech GMH) diluée dans du tampon Tris (10mM Tris, pH ajusté à 8.5) est rajoutée dans les puits de plaques stériles contenant les disques. Les disques sont alors incubés une nuit (16h +/-2h) sous agitation orbitale à l'abri de lumière.

Immobilisation du peptide agoniste par « chimie-click » avec PDA en utilisant le linker DBCO-amine

Nous avons alors opté pour une réaction de chimie-click sans cuivre, par sa facilité d'utilisation en milieu aqueux sans adjonction de catalytes cytotoxiques. Un tel procédé nécessite l'adjonction au niveau N-terminal des peptides mimant le CD31 d'un groupement azide en utilisant une lysine

modifiée (« peptides azide »). Après rinçage des disques, la troisième et dernière étape est réalisée : une solution de « peptides azide » à 50µg/ml (IRBM, Italie) était rajoutée aux disques. L'ensemble était agité une heure puis les disques étaient rincés avec de l'eau distillé et conservés secs jusque leur utilisation.

Analyse du revêtement

Le revêtement a été analysé par trois méthodes de surface : une analyse XPS, une analyse en microscopie à force atomique et une analyse en microscopie électronique.

L'analyse par XPS (précédemment décrite) a été conduite sur des disques en nitinol nus et fonctionnalisés avec analyse chimique des composants. La modification de la signature chimique à chaque étape et la disparition du signal métallique (notamment du titane) sont des signes indirects de l'homogénéité du revêtement (**Figures 19 et 20**).

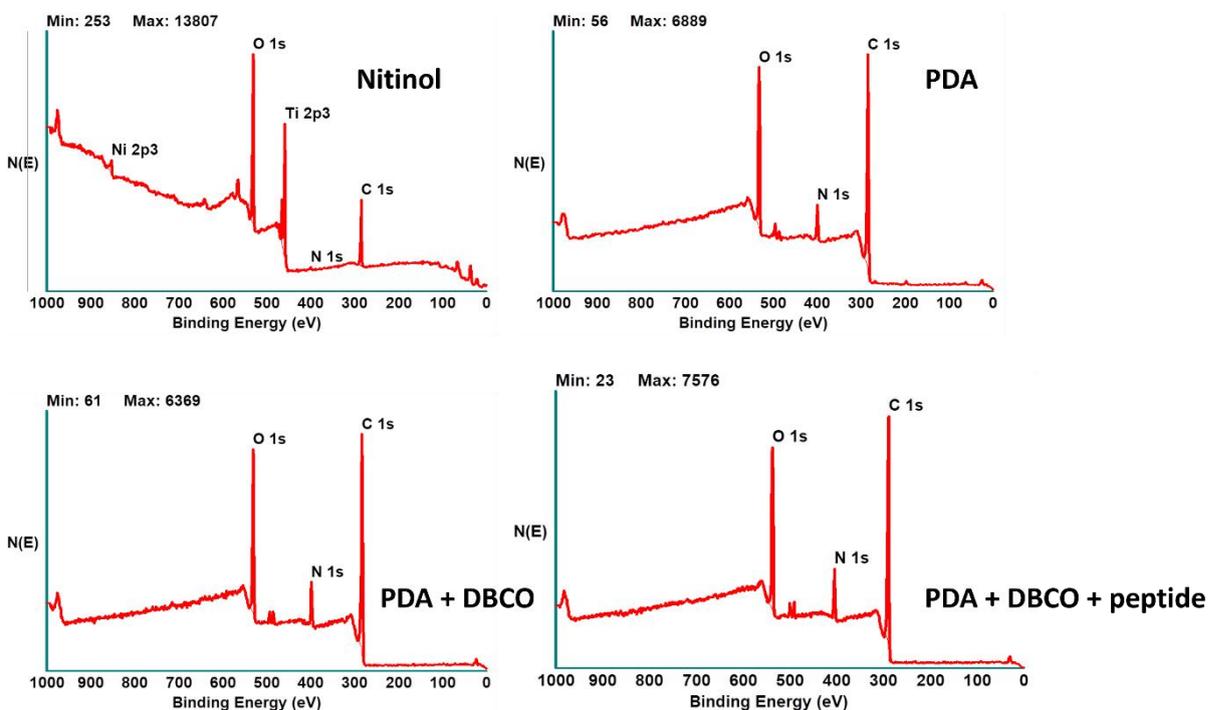


Figure 19. Analyse XPS des disques de nitinol fonctionnalisés à chaque étape du revêtement

PDA	C	O	N	O/C	N/C
Moyenne	72,3	20,9	6,8	0,29	0,09
SD	0,3	0,3	0,3		
PDA + DBCO					
Moyenne	70,0	22,6	7,3	0,32	0,10
SD	0,7	0,6	0,6		
PDA + DBCO +peptide					
Moyenne	71,2	20,5	8,3	0,29	0,12
SD	0,4	0,4	0,7		

Figure 20. Evaluation de la fonctionnalisation des surfaces par analyse XPS

Une analyse par microscopie à force atomique (MFA) a ensuite été réalisée pour obtenir plus d'informations sur la qualité et l'épaisseur du revêtement (nanotopographie). Cette analyse a été réalisée par le groupe Nobil Bio Ricerche (Italie). Ces mesures ont été réalisées sur un instrument NX10 Park (Park System, Suwon, Corée du Sud), équipée d'une boucle fermée XY de 20 bits, d'un scanner de flexion Z et d'un support PPP-NCHR 5M. Le mode True Noncontact [™]était active, permettant une interaction minimale avec la surface d'étude et la diminution d'artefacts. Une analyse en mode tapping a été réalisé sur quatre points à chaque étape du revêtement sur des disques en nitinol fonctionnalisés ((20 × 20, 10 × 10, 5 × 5, and 1 × 1 μm) at une fréquence de 0.1 Hz). L'analyse de surface retrouvait une épaisseur de revêtement de 4 nm, 10 nm, 12 nm et de 15 nm pour les surfaces nues, PDA, PDA + DBCO et PDA + DBCO + peptide respectivement (**Figure 21**). Les reconstructions tridimensionnelles retrouvaient également un revêtement homogène en « nid d'abeille » du revêtement final (**Figure 22**).

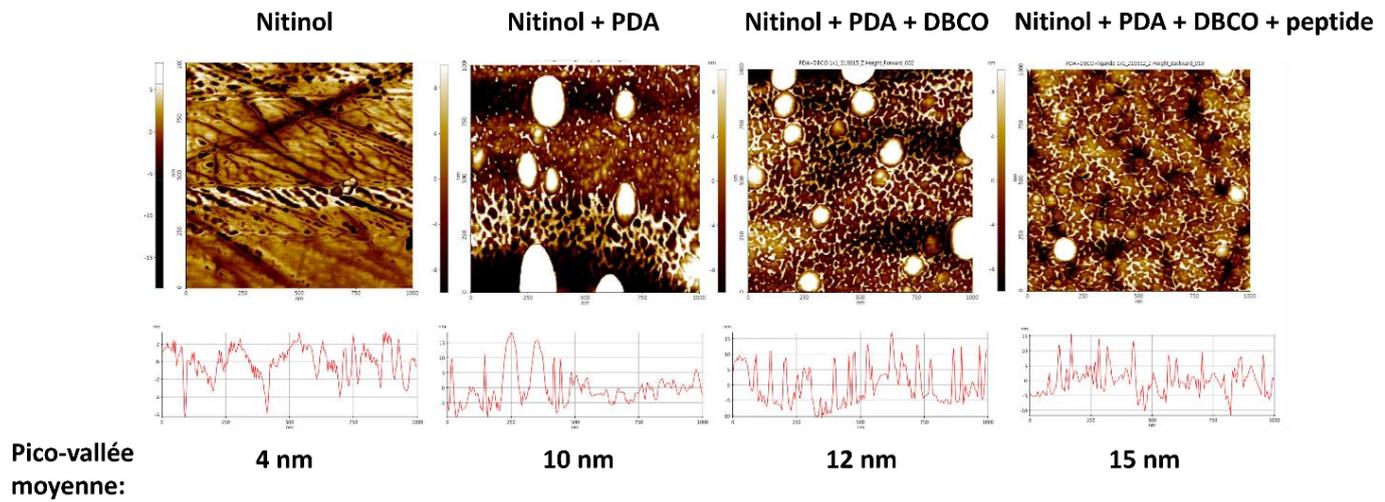


Figure 21. Analyse et mesure de l'épaisseur du revêtement par prise d'images sériées en microscopie à force atomique (AFM) « en face »

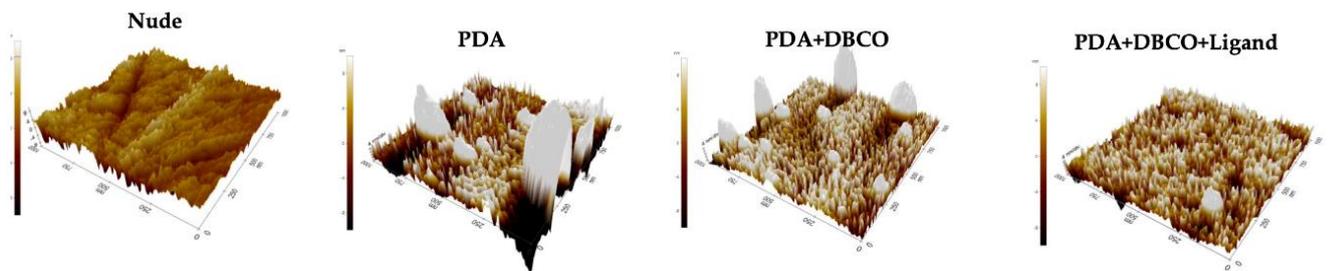


Figure 22. Déconvolutions des séries d'image en AFM « en face » et visualisation 3D du revêtement.

Les résultats de la caractérisation des surfaces expérimentales (nitinol, CoCr) ont donc montrés **la faisabilité de la fonctionnalisation des surfaces par le procédé de revêtement calibré par chimie-click sur couche de PDA comme nous l'avions envisagé.**

II. EVALUTION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES SURFACES COATEES *IN VITRO*

II.1. Endothélialisation et phénotype

Le nombre des peptides candidats étant considérable, nous devons restreindre notre choix aux plus « prometteurs », notamment afin de « raffiner », « réduire », et « remplacer » le nombre d'animaux dans les études *in vivo* (règle des 3R). Mais comment choisir ? Puisque notre objectif était de développer des surfaces aptes à être recouvertes par un endothélium fonctionnel, « physiologique », après la pose du dispositif dans l'aorte et les artères iliaques chez le petit animal, nous avons envisagé d'évaluer le degré de couverture et le phénotype adopté des cellules endothéliales aortiques humaines primaires (Human Aortic Endothelial Cells, HAEC, Lonza) au contact des surfaces d'études (disques en nitinol). Ainsi le nombre de cellules adhérentes et la distribution du CD31 à la surface, rapporté au degré de polymérisation des fibres de F-actine (traduisant un stress cellulaire par traction forcée du cytosquelette en l'absence de substrat biologique pour l'adhérence cellulaire (135)) ont été évalués à l'aide d'images de fluorescence traitées par masques par un logiciel d'analyse d'image ouvert (Fiji, NIH Image). Les conditions de contrôle comprenaient les disques « nus » (non fonctionnalisés, « bare ») ainsi que les disques fonctionnalisés seulement avec la PDA (groupe PDA), puisque cette couche a des propriétés adhésives *per se*. De plus nous avons également inclus des disques fonctionnalisés avec le peptide « P8RI », ciblant la portion cis-homophile, juxta-membranaire du CD31, afin d'évaluer la spécificité des propriétés conférées par les différents peptides produits pour ce travail.

Les cellules utilisées (HAEC, Lonza), étaientensemencées en nombre suffisant pour couvrir la surface (établi par des expériences pilotes avec densités croissantes de cellules) et cultivées dans du milieu basal (Endothelial Cell Basal Medium MV2, Lonza), sans facteurs de croissance, afin de prévenir l'activation induite par ces facteurs et permettre l'adoption d'un phénotype « au repos ». Les disques de nitinol ou de CoCr, nus ou fonctionnalisés, étaient au préalable stérilisés dans de l'éthanol, rincés dans du milieu de culture et disposés dans les puits d'unes plaques de culture (96 puits) et stérilisés comme décrit plus haut. Un volume de 100 µl de milieu contenant le nombre de cellules par puits retenu à la suite des expériences pilotes, 25 000 cellules HAEC, étaient alors en suite rajouté et les plaques étaient incubées à 37°C pendant 48h dans un incubateur à CO₂ (5%, **Figure 23**). Après 48h, Les surnageants étaient prélevés (pour analyse ultérieure des facteurs solubles) puis les disques avec les cellules adhérentes à leur surface étaient rincés dans du PBS, fixées au paraformaldéhyde et incubés avec du DAPI (marquage des noyaux), de la phalloïdine couplée à un fluorochrome vert (Alexa 488) et un anticorps anti-CD31 domain 1 (clone 9G11, conjugué à l'APC, **Figure 24**). Après rinçage, les disques ont été montés avec du ProlongGold, face

en bas, sur des disques à fond lamelle et alors analysées en immunofluorescence par un microscope inversé (Axio Observer, **Figure 25**).

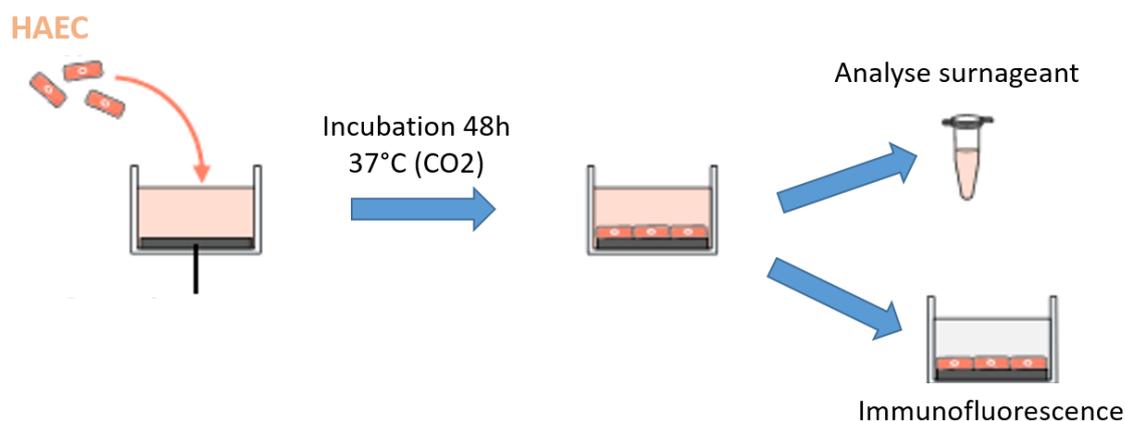


Figure 23. Schéma expérimental de l'analyse des cellules HAEC au contact des matériaux d'étude.

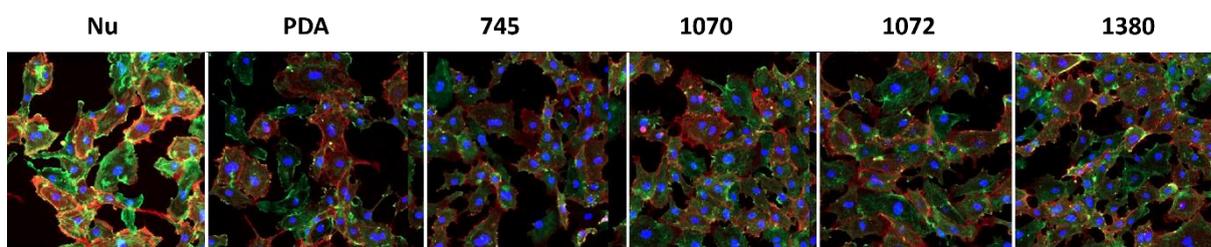


Figure 24. Exemple d'images x10 en microscopie à fluorescence des pastilles de nitinol.

Selon différentes conditions après marquage : noyau (bleu, DAPI), fibres d'actine F en vert (EGFP) et CD31 (Cy5, rouge). L'intensité de fluorescence de l'actine (vert) est notablement plus importante dans le groupe nu.

Analyse du surnageant : A la fin de l'incubation, les surnageants étaient transférés dans une plaque à fond conique et centrifugés à 2500g pendant 15 minutes permettant la sédimentation des débris cellulaires. 80 μ L de surnageant étaient alors récupérés et retransférés dans une nouvelle plaque 96 puits. L'analyse du surnageant comprenait la quantification en analyse multiplex des protéines solubles suivantes : le CD31, l'interféron gamma, l'IL-6, PAI-1 et le TNF-alpha. L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la croissance et la différenciation lymphocytaire et est présente dans la phase aigüe de l'inflammation aux côtés le TNF-alpha. PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) est une molécule serine protéase pro-thrombotique, inhibitrice du plasminogène tPA et de l'urokinase (uPA), toutes deux impliquées dans la fibrinolyse. Ces cinq marqueurs étaient quantifiés dans les surnageants de cellules HAEC après 48h de contact avec les surfaces d'étude sur six répliques techniques. Le surnageant des cellules HAEC était centrifugé à haute vitesse (300G, 5 minutes) pour éliminer tout débris cellulaire puis transféré et aliquoté dans une plaque en

polypropylène 96 puits pour congélation à -80°C . Lors de l'analyse, les échantillons étaient décongelés et dilués dans une solution tampon. Ces échantillons dilués au 1/5 (concentration déterminée par des manipulations préliminaires) étaient alors transférés dans une plaque 96 puits à fond plat contenant un mix de billes de capture. Une gamme standard était constituée de façon parallèle par dilution en cascade (Bio-Rad) avec une concentration connue de chaque antigène. La plaque était alors incubée sur un agitateur orbital pendant 1h pour la capture des antigènes par les anticorps de capture. La plaque était alors rincée de façon automatique au tampon de rinçage (Biorad) en maintenant les billes de marquage au fond des puits. Les anticorps de détection biotinylés étaient dilués selon les instructions du kit multiplex et incubés pendant 30 minutes. Après un nouveau rinçage, de la streptavidine-PE était rajoutée à chaque puits et incubée pendant 10 minutes, permettant la liaison de la streptavidine à la biotine des anticorps de détection. Après un dernier rinçage, les billes étaient resuspendues dans de l'assay buffer et analysées sur la machine de lecture (Bio Plex 200, Bio Rad). L'analyse statistique était menée avec le test de Kruskal Wallis permettant une analyse ANOVA en s'affranchissant du faible nombre de répliques. Le seuil de significativité était de $p = 0.05$.

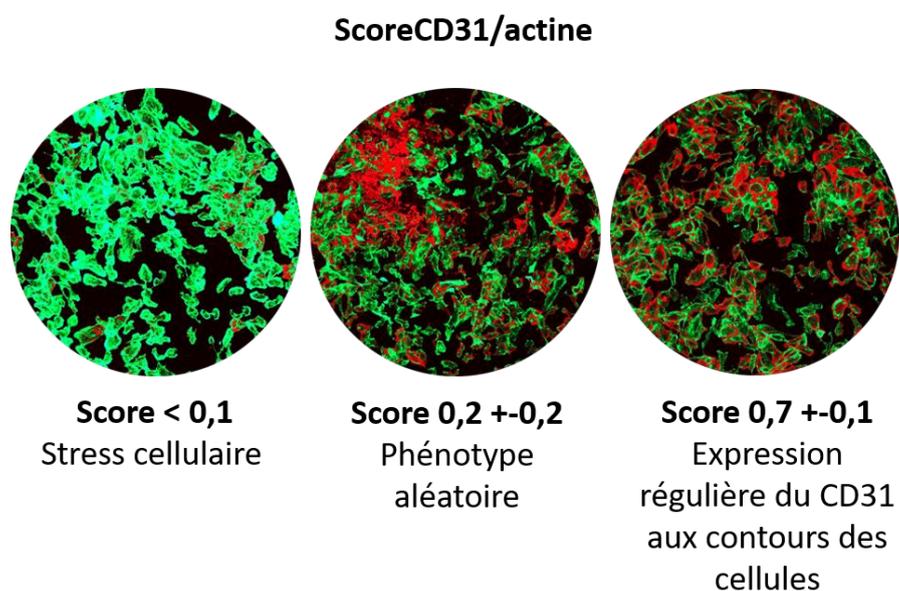


Figure 25. Exemple de score phénotypique des cellules endothéliales

L'analyse en microscopie à fluorescence retrouvait macroscopiquement une intensité de fluorescence du canal EGFP (correspondant aux fibres de stress de F-actine) plus importante par rapport à l'intensité de la fluorescence dans le canal rouge Cy5 (CD31) dans tous les répliques du groupe pastilles nues par rapport à tous les autres groupes ($p < 0.01$). Le ratio CD31/actine a ensuite

été appliqué pour chaque groupe d'étude. Le ratio CD31/actine dans le groupe nus était le plus bas, témoignant du statut « stressé » des cellules au contact des disques en nitinol nus. Comme observé précédemment (126), ce score était plus élevé dans le groupe PDA. Le score était significativement plus élevé dans tous les groupes de peptide trans-homophiles, que ce soit par rapport au groupe nus mais également PDA. En d'autres termes, les cellules HAEC présentaient un stress cellulaire important au contact du nitinol non fonctionnalisé et un stress diminué lorsqu'elles étaient au contact de surfaces fonctionnalisées, y compris la PDA. En revanche, comme observé dans les travaux antérieurs de l'unité (126), le score obtenu avec le P8RI n'était pas statistiquement plus élevé que celui obtenu avec la PDA, confirmant que l'engagement du CD31 « entier » (non clivé) par le P8RI était limité dans le contexte de cellules endothéliales quiescentes. Ce résultat peut être expliqué par l'encombrement stérique des six domaines extra-cellulaires intacts du CD31 et donc un faible accès au domaine 6 du CD31.

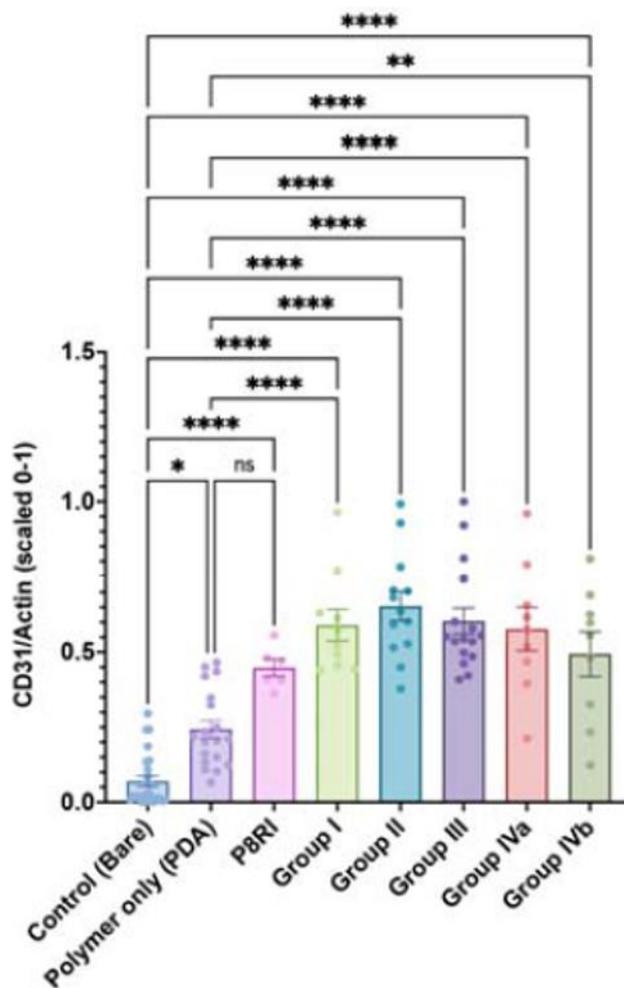


Figure 26. Score phénotypique basé sur le ratio CD31/Actine F normalisé de 0 à 1 pour permettre la comparaison statistique entre toutes les conditions sur disques de nitinol.

Le surnageant de culture a été utilisé pour évaluer le degré d'activité pro-inflammatoire des cellules endothéliales cultivées sur les différentes surfaces mais nous n'avons pas réussi à doser les cytokines pro-inflammatoires solubles, en raison de valeurs sous la gamme de détection (probablement en raison d'une dilution des échantillons -nombre de cellules dans le volume de milieu de culture- trop importante).

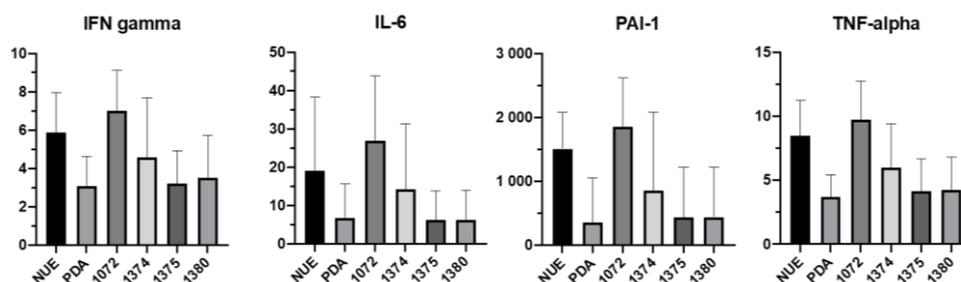


Figure 27. Résultats de l'analyse multiplex dans les différents groupes d'étude.

Le dosage du CD31 soluble était quant à lui fiable. De façon surprenante, l'analyse du surnageant des cellules endothéliales cultivées avec les peptides retrouvait une quantité significativement plus élevée de CD31 soluble dans les groupes SP1072 (6100 pg/ml +/- 750) et SP1374 (6250 pg/ml +/- 500) par rapport aux disques nus non fonctionnalisées (4000 pg/ml +/- 800, $p = 0.03$ et $p = 0.023$, **Figure 28**). Cette observation n'était cependant pas contributive pour la sélection. En effet, les protéines transmembranaires comme le ICAM-1, le VCAM-1, la E-Selectine et le CD31 lui-même subissent toutes un clivage au moment de l'activation cellulaire et nous pensions nous servir de l'analyse de leur partie soluble pour évaluer l'étendue de leur clivage et donc de l'activation cellulaire. Mais la production de ces molécules est aussi fonction de l'état adhérent ou non des cellules endothéliales (136) et, en considérant un turn-over de 3 à 6 heures pour leur synthèse, on peut envisager qu'elles aient pu augmenter à la surface des cellules au bout de 48h de culture. C'est en effet ce que l'analyse des cellules adhérentes indique avec l'augmentation de l'expression du CD31 à la surface des cellules adhérentes sur les supports expérimentaux. Ainsi, pour exploiter ces dosages, nous aurions dû inclure la quantité de la partie relarguée par rapport à la quantité de protéine exprimée à la surface des cellules adhérentes.

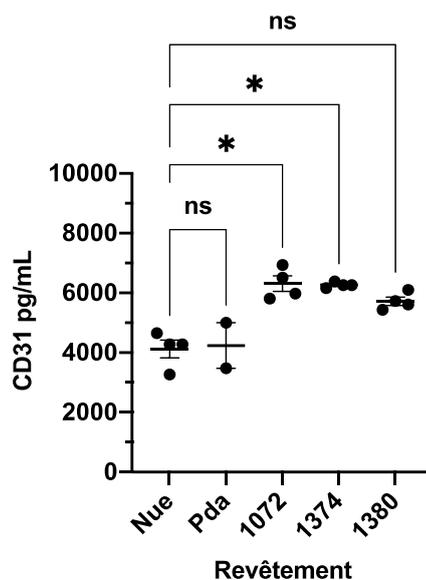


Figure 28. Dosage CD31 soluble dans les surnageants de disques en nitinol au contact de cellules endothéliales

Quantification de la vitesse d'endothélialisation. Un scratch-assay a ensuite été conduit afin de pouvoir monitorer l'étendue et la vitesse d'endothélialisation par des cellules HAEC in vitro (Incucyte, Sartorius, Allemagne). Le principe du scratch-assay est de réaliser une « blessure » (Incucyte® Wound Maker 96-Tool, Sartorius) sur le tapis cellulaire monocouche de cellules endothéliales ayant préalablement recouvert la surface de plaques en polypropylène dédiées (Incucyte® Imagelock Plates) puis de pouvoir réaliser des images à des intervalles de temps dédiés (**Figure 29**). Le logiciel (Incucyte® Scratch Wound Analysis Software Module, Sartorius) sera à même de calculer la surface ré-endothélialisée en fonction du temps.

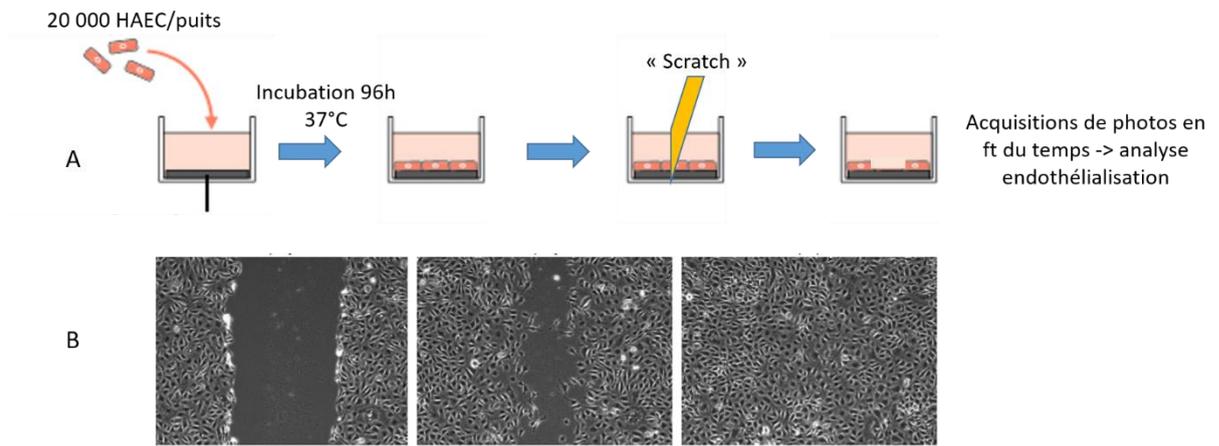


Figure 29. A. Schéma expérimental du scratch-assay. B. Images d'acquisition de l'Incucyte à H0, H+12 et H+24 après réalisation du scratch sur des cellules HAEC.

Une plaque 96 puits (Incucyte® Imagelock Plate) a été préalablement préparée en six groupes (6 réplicas par groupe) : surface non traitée (nue), fonctionnalisée à la PDA uniquement (PDA) puis fonctionnalisée PDA avec 4 peptides : P8RI, SP1072, SP1374 et SP1380 selon le protocole précédemment décrit pour les disques. Des cellules HAEC à la concentration de 20 000 cellules/puits (200ml) ont ensuite été ensemencées dans tous les puits puis maintenues en culture pendant 96 heures afin d'obtenir la confluence. Une fois à confluence, le « scratch » a été réalisé en conditions stériles sous hotte. La plaque a été immédiatement placée dans l'Incucyte et les acquisitions commencées à H0 puis toutes les 15 minutes pendant 150 heures. Le logiciel (Incucyte® Scratch Wound Analysis Software Module, Sartorius) permet l'étude de la surface endothélialisée à chaque acquisition. Les données ont ensuite été étudiées en analyse de variance pour analyser la vitesse d'endothélialisation. La confluence était quantitativement plus importante pour tous les groupes d'étude par rapport aux puits nus avec le meilleur résultat observé dans le groupe SP1072 (**Figure 29**). En analyse de variance, la vitesse d'endothélialisation était significativement plus importante dans les groupes SP1072 et SP1380 par rapport aux puits nus ($p < 0.001$, **Figure 30**).

Confluence sur zone lésée

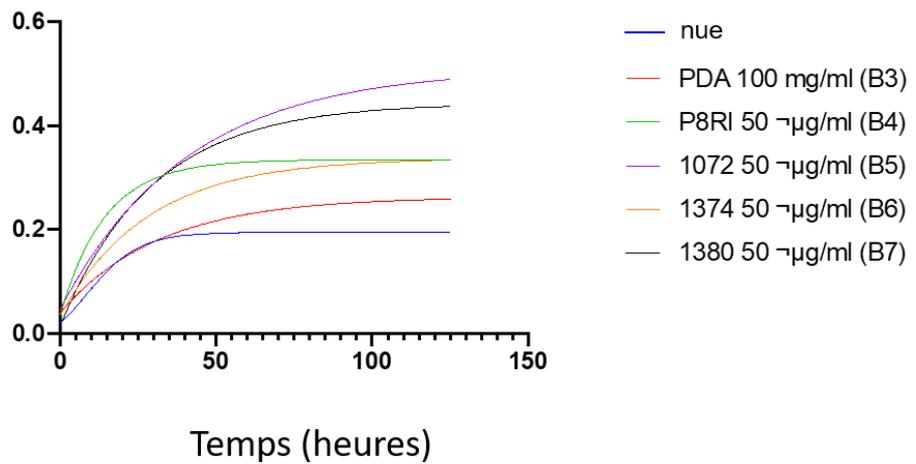


Figure 30. Confluence sur zone lésée en fonction du temps avec différentes conditions.

La confluence la plus importante, témoignant de la meilleure endothélialisation in vitro, était observée dans les groupes SP1072 et SP1380.

Confluence sur zone lésée

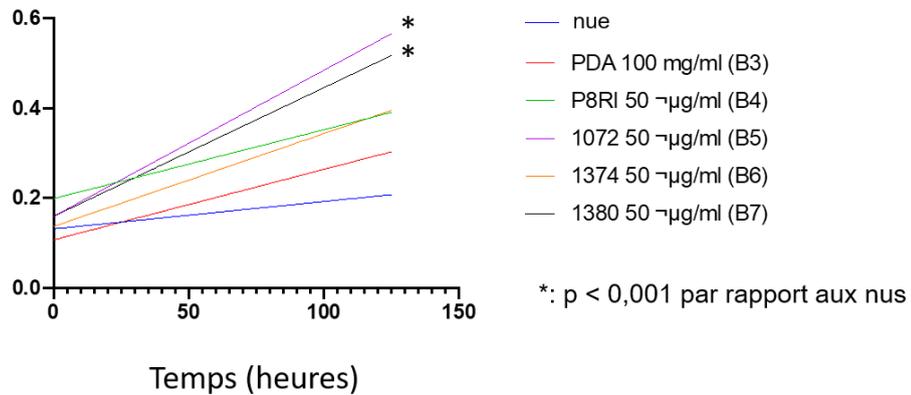


Figure 31. Vitesse de confluence sur zone lésée en fonction du temps avec différentes conditions.

La vitesse de confluence était significativement plus importante dans les groupes SP1072 et SP1380 par rapport au groupe nus.

II.2. Hémostabilité

L'hémostabilité est un critère d'évaluation majeur des matériaux composant les dispositifs médicaux. Le test le plus utilisé est le test d'hémolyse. Au vu des propriétés « adhésive » de notre revêtement, nous avons complété l'évaluation de l'hémostabilité avec l'analyse de la réaction des éléments figurés du sang au contact avec les surfaces, en termes d'adhérence (en particulier l'adhérence des plaquettes) et en termes de relargage de facteurs pro-coagulants, ces derniers éléments pouvant conditionner la survenue d'événements thrombotiques. Ces tests en sang total ont été effectués en condition « dynamique » (agitation orbitale) dans cinq groupes : disques en CoCr nus, disques fonctionnalisés avec de la PDA uniquement et trois peptides parmi les plus prometteurs sur la base des résultats des tests utilisant les cellules HAEC (SP1072, SP1374 et SP1380).

II.2.a. Hémostabilité dans les surfaces nues et traitées

Le test d'hémolyse est indispensable pour évaluer la sécurité des dispositifs médicaux endovasculaires. Ce test permet de mettre en évidence une lyse des érythrocytes, directe (par contact) ou indirecte (par relargage de molécules cytotoxiques).

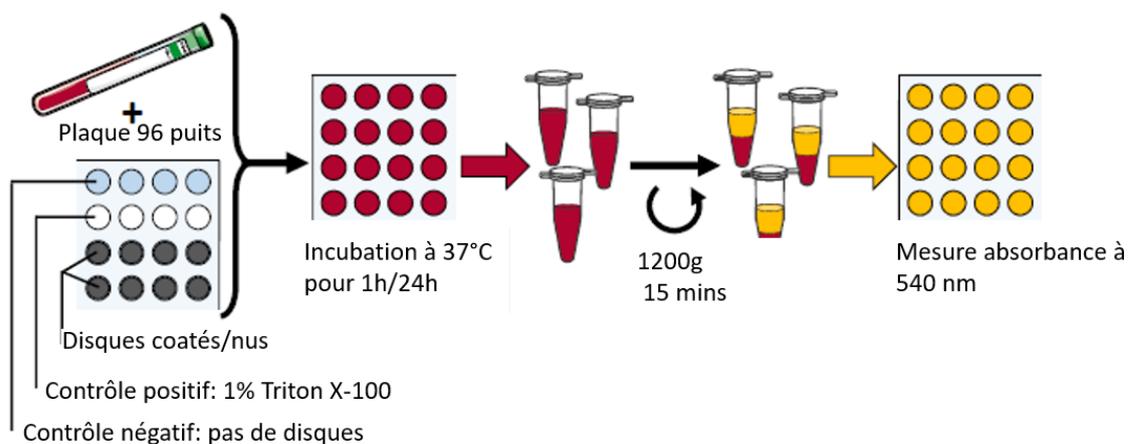


Figure 32. Schéma expérimental du protocole pour le test d'hémolyse

Des disques de CoCr nus et fonctionnalisés selon le protocole décrit plus haut ont été placés dans une plaque 96 puits en polypropylène, préalablement stérilisée à l'aide d'éthanol absolu pendant 10 minutes. L'éthanol a été retenu comme méthode de stérilisation pour son absence d'action sur la

composition chimique de peptides. Les disques étaient préalablement rincés à l'eau distillée avant un dernier bain au NaCl 0.9%. Du sang veineux total périphérique était alors prélevé et placé dans des tubes PPACK (75 mM PPACK + 0.1% D-mannitol, Haemtech SCAT- 875B). Le PPACK (Phe-Pro- Arg-chlorométhylcétone) est un inhibiteur peptido-mimétique de la thrombine qui inhibe la cascade de la coagulation sans affecter la concentration physiologique de calcium ionisé. 200 µl de sang était alors distribué par puits et la plaque était incubée à 37°C pendant 1h sous agitation. L'héparine a été choisi comme anticoagulant pour ne pas interférer avec le test d'hémolyse. Les puits sans disques étaient utilisés comme contrôles négatifs et du Triton X100 à 1% a été utilisé comme contrôle positif pour son action érythrolytique par dissolution de la membrane des érythrocytes. A la fin de l'incubation, le sang était transféré dans une plaque à fond conique et centrifugés à 2500g pendant 15 minutes. 50 µL de plasma pauvre en plaquettes (PPP) était alors récupérés et retransférés dans une nouvelle plaque 96 puits. L'absorbance était alors analysée à 560 nm dans un spectrophotomètre (GloMax), qui est la longueur d'onde correspondant au pic d'absorbance de l'hémoglobine libre, libérée lors de l'hémolyse. Cette valeur est directement proportionnelle au degré d'hémolyse

Pour chaque manipulation, les valeurs ont été normalisées en utilisant les contrôles positifs et négatifs avec la formule suivante : $R(x) = \frac{A540nm(x) - A540nm(\text{pas de disques})}{A540nm(\text{Triton}) - A540nm(\text{sans disques})}$. R(x) représente le ratio normalisé du groupe x et A540nm (x) la valeur moyenne de l'absorbance des puits du groupe x.

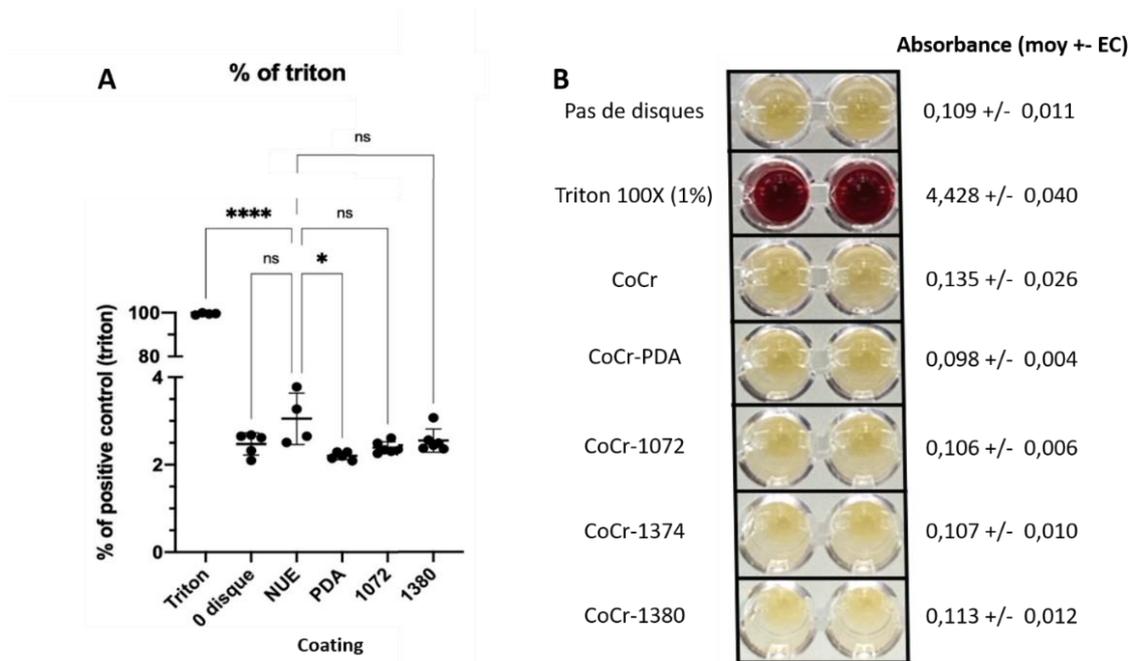


Figure 33. A. Ratio d'hémolyse des surfaces d'études après 1h d'incubation. B. Photographie d'une plaque contenant du PPP à la fin du test d'hémolyse et valeurs d'absorbance par condition.

Les contrôles positifs (Triton) sont les seuls à apparaître en rouge, témoignant de la libération d'hémoglobine libre durant l'hémolyse.

Ces résultats ne retrouvent pas de différence significative en termes d'hémolyse entre les contrôles négatifs et les disques fonctionnalisés à 1h de contact. L'hémolyse n'était pas significativement augmentée dans les groupes d'études par rapport aux surfaces nues. On notait une diminution significative de l'hémolyse dans le groupe PDA vs. groupe nu ($p = 0.03$).

II.2.b. Réaction des éléments figurés du sang au contact des surfaces nues et traitées

L'étude de la réaction du sang a été menée en évaluant les éléments figurés du sang adhérent sur les pastilles ainsi que le calcul des concentrations des facteurs solubles relargués dans le surnageant centrifugé à haute vitesse (plasma pauvre en plaquettes, PPP) pour ne pas biaiser la mesure avec d'éventuelles microparticules également relarguées. Une fois l'absorbance des PPP obtenue, les PPP ont été ensuite utilisés pour étude de l'hémolyse. Les disques ont été plusieurs fois rincés soigneusement avec du NaCl 0.9% puis les disques ont été transférées dans une nouvelle plaque 96 puits contenant de la PFA 4% (10 min) permettant la fixation des éléments sanguins ayant adhérents à la surface des pastilles. Cette étape précède la visualisation des plaquettes adhérentes aux disques par technique d'immunofluorescence. Nous avons choisi l'antigène CD61, qui est un abondant récepteur plaquettaire, constitutivement exprimé à leur surface. Après élimination de la PFA par un lavage au PBS, les disques ont été incubés dans une solution contenant un anticorps dirigé contre le CD235A (marquage de la protéine associée à la glycophorine A afin de marquer les érythrocytes), le Hoechst 33342 (marquage nucléaire, donc des leucocytes) et d'un anticorps dirigé contre le CD61 (intégrine $\beta 3$, abondamment exposée à la surface des plaquettes). Après une nuit à 4°C, les disques furent rincés au PBS, et montés retournés (pour microscopie à IF inversé) sur des plaques Ibidi avec du milieu de montage (Prolong Gold Antifade Mountant, ThermoFisher). Des photographies digitales de ces échantillons ont été réalisées l'aide d'un microscope à immunofluorescence inversé Axio Observer (Zeiss) équipé du logiciel Zen (Zeiss). Les constituants sanguins recouvrant la surface des disques ont ainsi été visualisés puis quantifiés à l'aide du logiciel d'analyse d'image Fiji. Macroscopiquement, les surfaces nues présentaient plus d'agrégats plaquettaires que les autres groupes. L'analyse digitale des disques retrouvait que le nombre de plaquettes était significativement plus élevée dans le groupe des pastilles nues que dans les groupes PDA et SP1072 (respectivement $p = 0.04$ et 0.01). Les concentrations de CD62-P dans les surnageants ne présentaient pas de différences statistiquement significatives entre les différents groupes d'étude. Ce résultat peut s'expliquer par une possible activation des plaquettes au prélèvement, étant donné la présence de CD62-P dans le groupe contrôle négatif (sans disques). Ces résultats suggèrent que les surfaces fonctionnalisées ne sont pas plus thrombogènes que les surfaces nues non fonctionnalisées, et que le nombre de plaquettes agrégées est diminué dans les groupes PDA et SP1072.

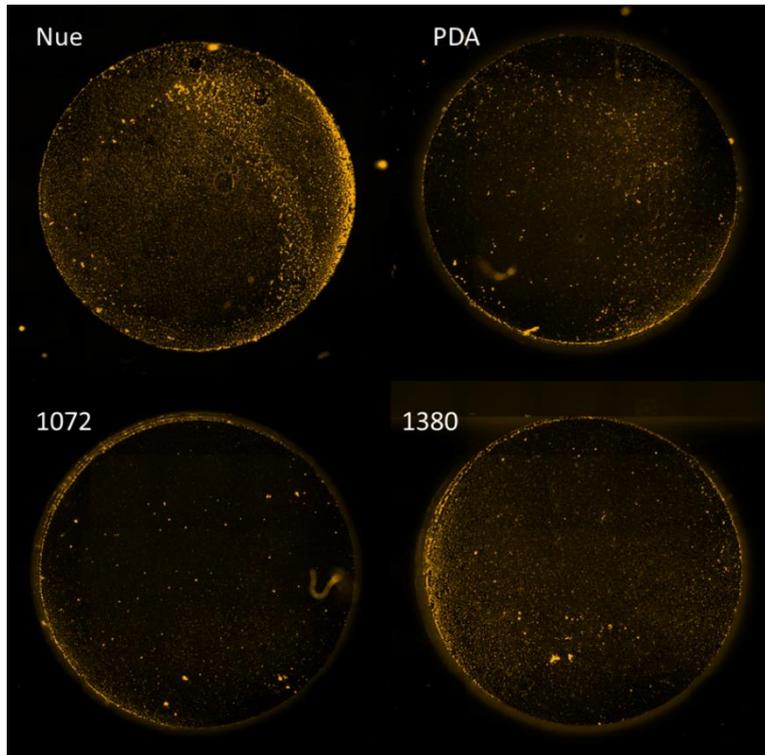


Figure 34. Microscopie à fluorescence en canal Cy3 de disques de CoCr.

Sous différentes conditions, après exposition d'1h en sang total avec marquage CD61-P (mesure d'adhésion plaquettaire).

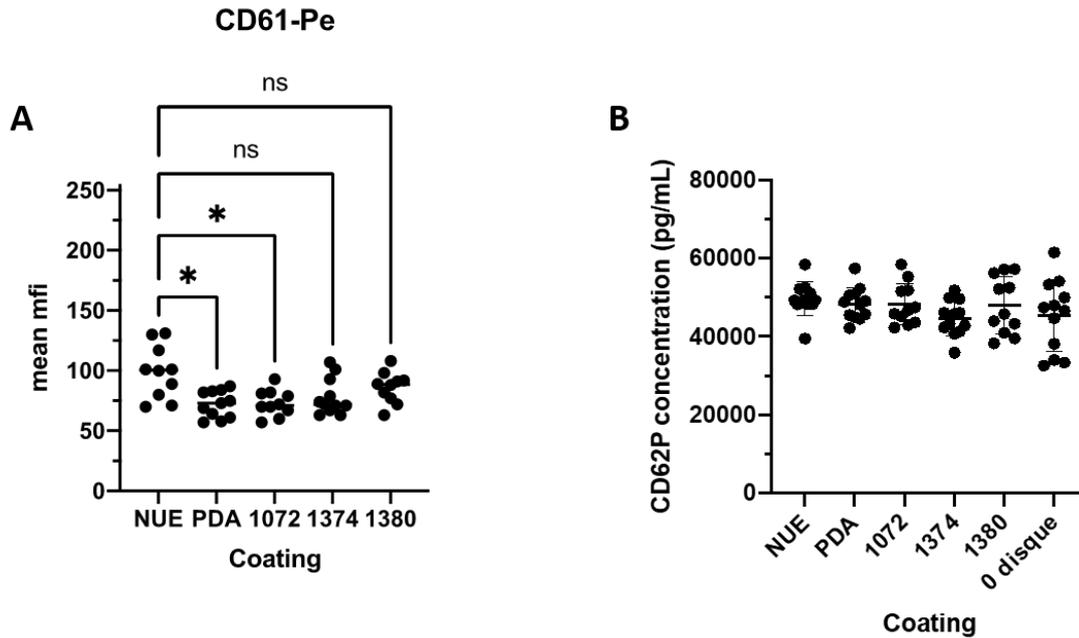


Figure 35. A. Expression de l'intensité de fluorescence moyenne du CD61-P par condition ($p = 0.01$ PDA vs nue et $p = 0.016$ pour SP1072 vs nue). B. Expression de la concentration en CD62 dans les surnageants des surfaces d'études.

Sur la base de nos résultats in vitro, le meilleur peptide candidat semble être le SP1072, le complexe « PDA + peptide SP1072 » semblant favoriser :

- Une endothélialisation fonctionnelle des cellules HAEC sur les surfaces expérimentales de nitinol et CoCr
- Une endothélialisation plus rapide que les surfaces non traitées
- Un phénotype anti-thrombotique non inférieur aux surfaces non traitées

III. Transfert de la technique de revêtement sur des dispositifs endovasculaires

Une fois l'étape de revêtement validée, nous avons changé d'échelle en vue de la fonctionnalisation des dispositifs endovasculaires entiers suivants : flow-diverters en nitinol (utilisés pour le traitement des anévrismes intracrâniens) et stents en CoCr (utilisé en pathologie coronarienne). Cette variété de dispositifs a été retenue pour tester la versatilité du revêtement sur la base de nos résultats préliminaires. Les dispositifs fonctionnalisés étaient alors analysés à l'aide d'un microscope numérique (VHX 7000, Keyence, Osaka, Japon). Ce microscope permet une acquisition 4K en trois dimensions et à très haute définition des dispositifs fonctionnalisés et des grossissements allant jusqu'à x 2500, suffisant pour mettre en évidence la présence d'un revêtement de PDA et le caractériser.

III.1. Flow diverters

Des stents flow-diverters non couverts en nitinol (3 mm x 60 mm, Sinomed, Chine) ont été fonctionnalisés selon le protocole précédemment décrit, breveté sous le numéro WO2021EP64257. Brièvement, ces dispositifs étaient nettoyés par ultrasons dans des bains successifs d'acétone, d'alcool et d'eau distillée puis étaient placés dans le bain alcalin de dopamine à 2mg/ml sous agitation pendant 20 ± 2 heures à l'abri de la lumière. Après lavage et nettoyage aux ultrasons pour enlever le surplus de PDA, les dispositifs ont été mis en présence du linker (DBCO-Sulfo-PEG(4)-NH₂, IRIS Biotech GMH). Enfin, la dernière étape consistait en la fonctionnalisation avec le peptide d'intérêt a été menée (50 µg/ml). Une fois cette dernière étape effectuée, les dispositifs étaient rincés puis conservés de façon stérile.

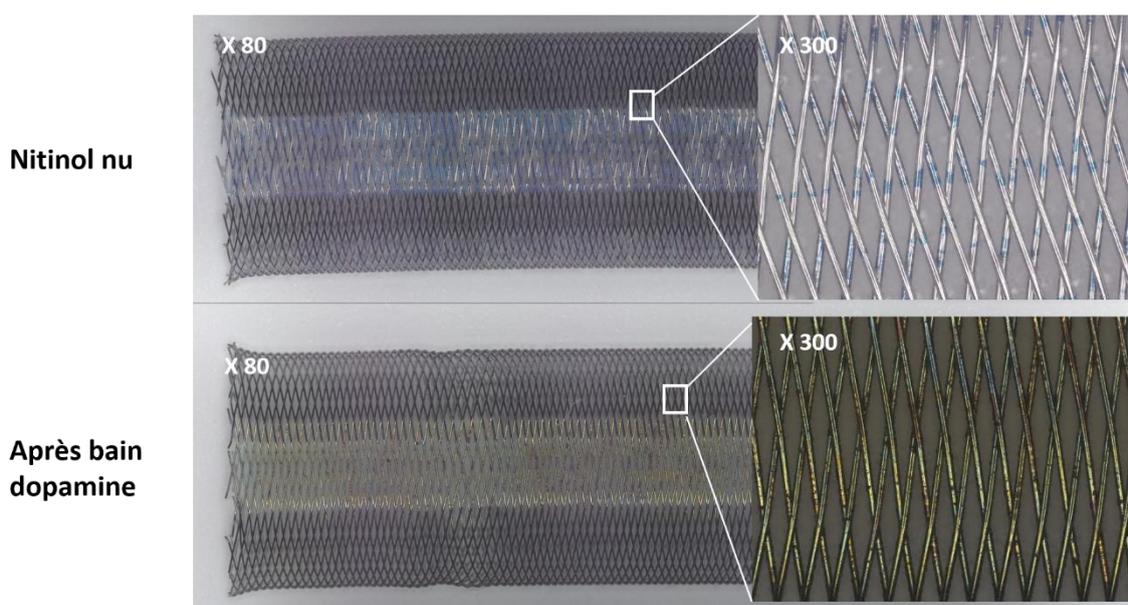


Figure 36. Flow-diverters en nitinol avant et après 22h de traitement à la dopamine (x 80 et x300)

III.2. Stents en cobalt-chrome

Des stents en CoCr (2 mm de diamètre x 30 mm de longueur, Sinomed, Chine) ont été fonctionnalisés par le même processus. Des tests de constriction (crimping) et d'inflation sur ballonnet ont été menés afin de déterminer si les contraintes mécaniques pouvaient causer des dommages au revêtement de PDA.

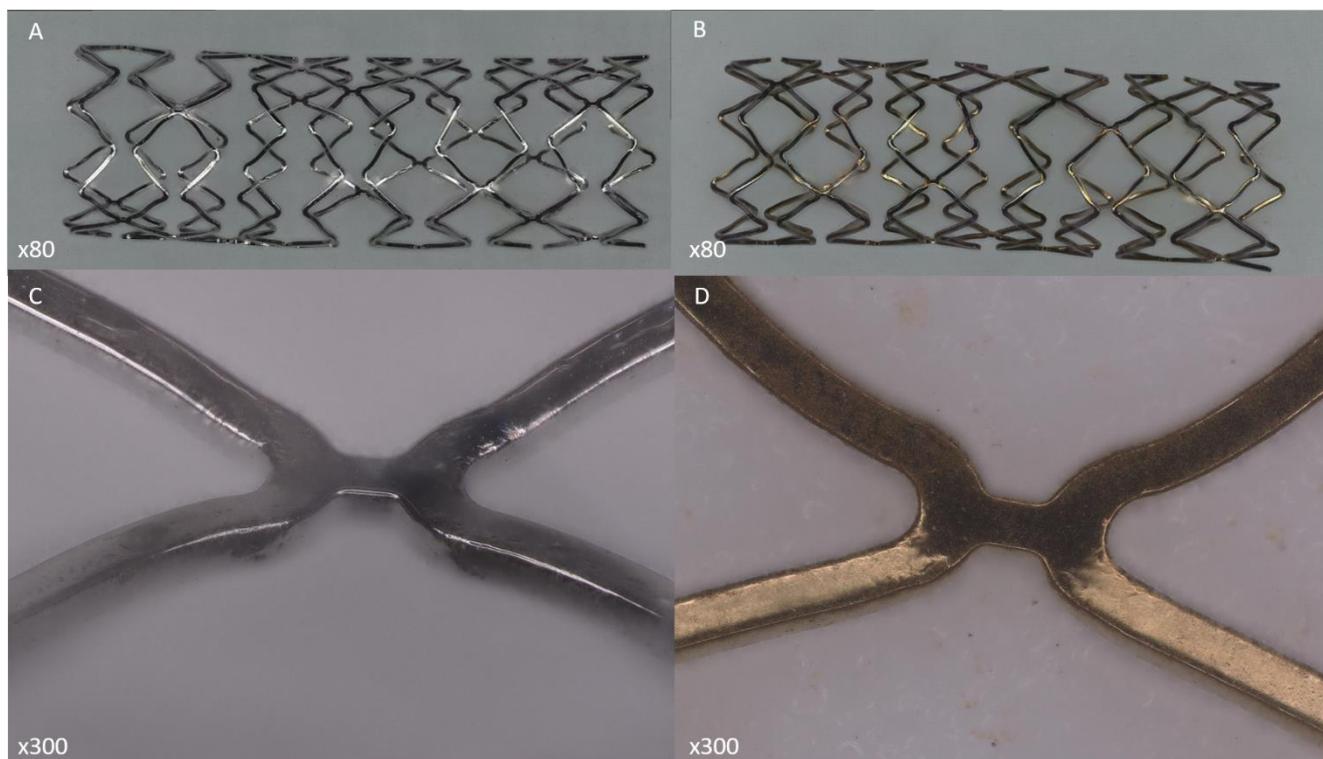


Figure 37. Microscopie optique de stents nus en Cobalt Chrome (A, C) et après traitement à la dopamine, suivi d'une contrainte et inflation sur ballonnet (crimping-decrimping, B, D). Absence de lésion significative macroscopique du revêtement.

L'analyse du stent après crimping et inflation ne semblait pas montrer de lésions significatives du revêtement à la dopamine.

Une analyse en microscopie électronique à balayage a été réalisée pour observer l'aspect microscopique du revêtement final sur des stents CoCr (Sinomed). Cette analyse a été menée par le Dr. Choqueux (INSERM U1148) en utilisant un MEB FEI Quanta FEG 250 (Philips, 20 kV). Les stents étudiés étaient tous recouverts d'un film continu avec la présence de quelques agrégats, estimé à 15 nm.

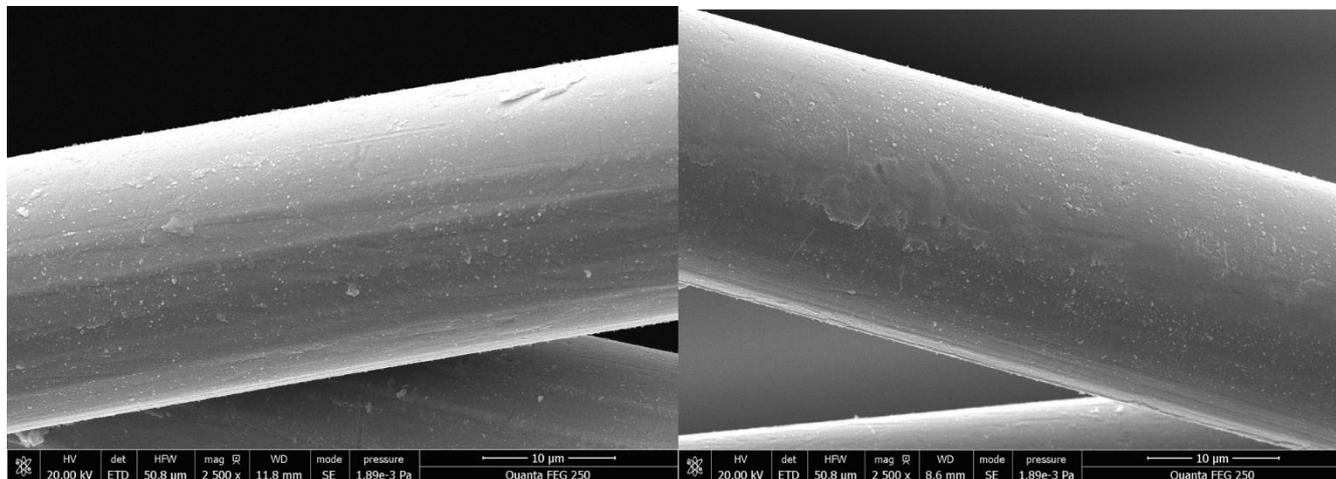
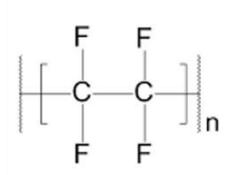


Figure 38. Microscopie électronique à balayage d'un stent en Cobalt Chrome fonctionnalisé (3 étapes).

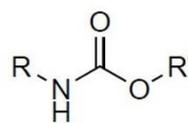
III.3. Stents couverts en CoCr et PTFE

A- Stents rudimentaires

Une fois la preuve de concept de fonctionnalisation à la dopamine de stents nus en nitinol et CoCr, nous nous sommes attelés à la fonctionnalisation de stents couverts. Les seuls stents couverts de petit diamètre utilisables chez le rongeur sont des stents coronaires présentant une armature en CoCr et entouré de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou de polyuréthane (PU), l'intérêt translationnel étant le développement d'endoprothèses fonctionnalisées pour le traitement des AAA chez l'Homme. La fonctionnalisation de stents couverts représente un défi technique supplémentaire : il faut pouvoir revêtir à la fois le CoCr mais surtout le PTFE ou le PU, qui représente le composé majoritaire au contact du sang circulant de la paroi du vaisseau. Le deuxième défi est la nécessité de revêtir les faces luminales et abluminales du stent, en prenant en compte le caractère hydrophobe des enveloppes externes de PTFE et de PU (**Figure 39**). Cette caractéristique représente la principale limitation du revêtement à la PDA, dont la versatilité réside en partie sur sa capacité à se fixer des groupements hydrophiles.



Polytétrafluoroéthylène



Uréthane

Figure 39. Compositions chimiques du PTFE et du PU, aux caractéristiques hydrophobes.

Dans des travaux préliminaires, nous avons étudié la fonctionnalisation de carrés de PTFE (Sinomed, Chine) de 5 mm x 5 mm fonctionnalisés par notre méthode usuelle mais sous agitation orbitale pendant 24h. Les premiers résultats semblent satisfaisants avec le recouvrement d'une couche de PDA sur le PTFE en analyse microscopique (**Figure 40**).

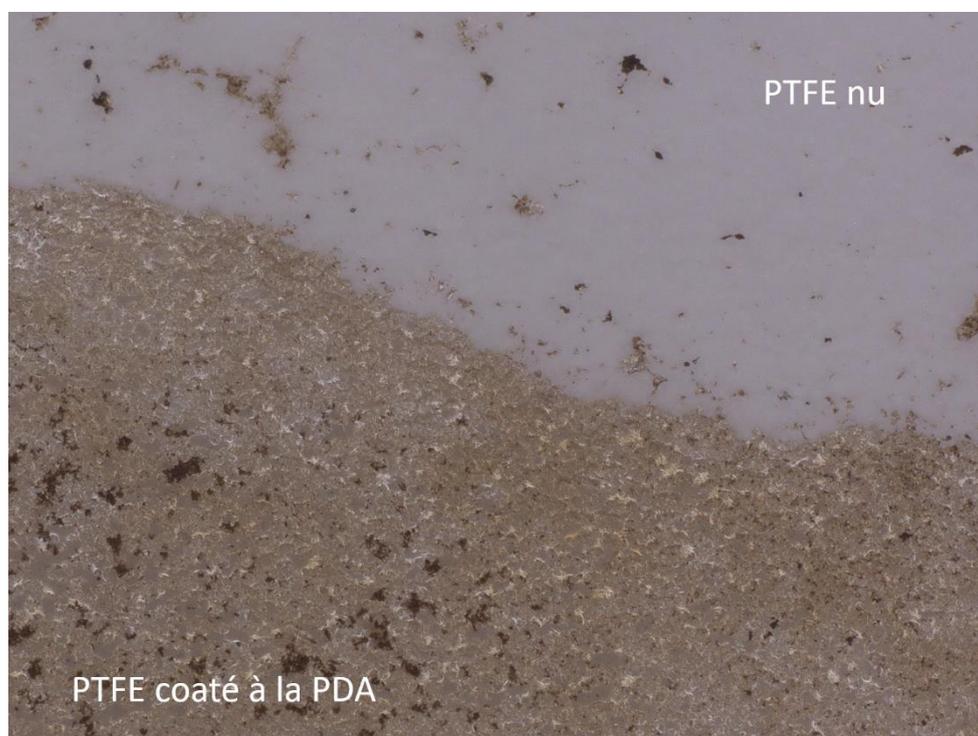


Figure 40. Microscopie optique x 300 de la jonction d'un segment de PTFE traité à la PDA.

Noter l'aspect granuleux et irisé du revêtement de PDA.

Nous avons ensuite conçu des stents couverts rudimentaires en utilisant une armature de CoCr recouverte de PTFE pour analyser, préalablement à l'utilisation de stents de l'industrie couteux (500 euros/pièce), la qualité du revêtement des faces luminales et abluminales. Les stents étaient des stents en CoCr de 30mm de long pour un diamètre de 3 mm (Sinomed, Chine). Les stents étaient d'abord contraints (« crimpés ») sur un ballonnet de mêmes dimensions (Sinomed) à l'aide d'un crimper Squeeze Buddy RSS (Blockwise, Arizona, USA). Un tube de PTFE (2.5 cm de long, 3 mm de diamètre)

était ensuite placé sur le stent puis le ballon était rééxpandu à 15 ATM pour fixer le PTFE avec sa seule force radiaire. Les stents couverts rudimentaires étaient alors fonctionnalisés à la dopamine sous agitation (roue) pendant 22 heures.

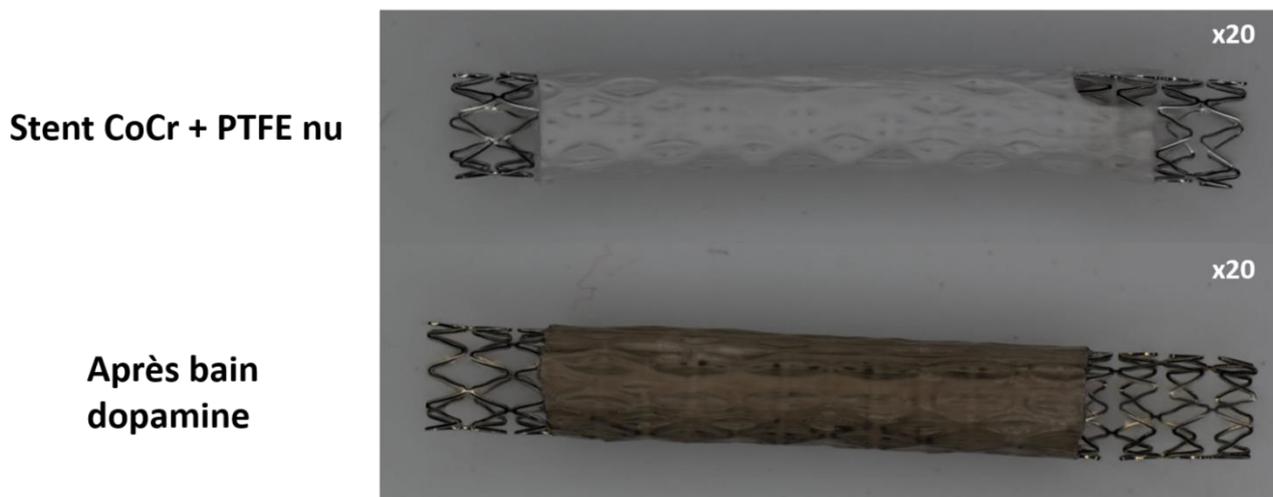


Figure 41. Aspect microscopique de stents rudimentaires CoCr + PTFE avant et après traitement à la dopamine.

Une étude microscopique (VHX) a été menée pour évaluer la qualité du recouvrement des composants du stent (CoCr et PTFE) par le film de PDA. Le principal écueil attendu était la qualité du recouvrement du PTFE au vu de son caractère hydrophobe. Nous avons constaté un revêtement du PTFE présent sur les deux faces du stent rudimentaire, avec toutefois un revêtement plus homogène de la face externe (**Figures 42, 43**). Le revêtement du stent en lui-même ne retrouvait pas d'anomalie macroscopique. Un tel contraste de revêtement peut s'expliquer par le caractère hydrophobe du PTFE et le petit diamètre du stent ne permettant pas la pénétration de la solution de PDA de façon optimale dans la face luminale du stent.



Figure 42. Aspect microscopique (VHX) des faces luminales et abluminales du revêtement en PTFE après dip-coating durant 22h.

Noter la différence de revêtement entre les deux faces, et la présence d'un revêtement plus léger entre les mailles du stent (enlevé ici) témoignant d'une probable hydrophobicité trop importante et d'une pénétration insuffisante de la solution de dopamine au sein du stent.

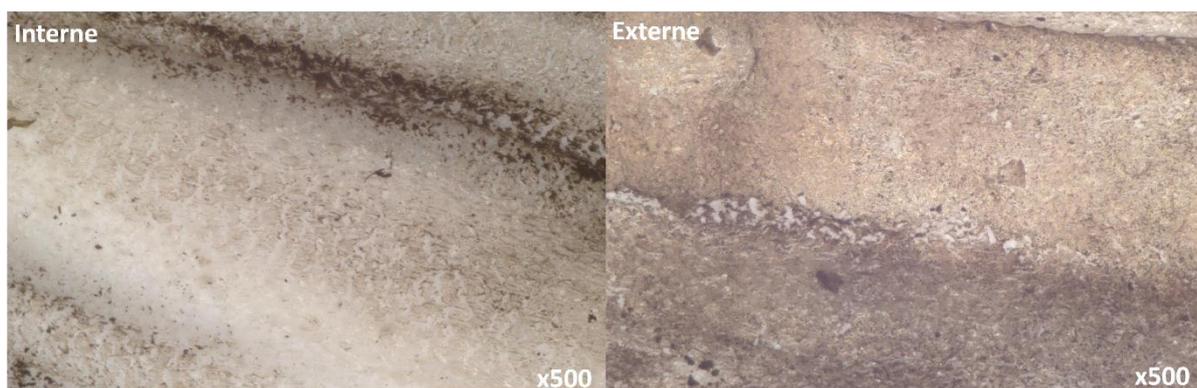


Figure 43. Aspect microscopique (VHX) de la couche de PTFE de stents rudimentaires après 22h de dip coating.



Figure 44. Aspect microscopique (VHX) de l'armature CoCr des stents rudimentaires après 22h de dip coating.

Noter l'aspect homogène du coating et la présence de zones de non-couvrement.

Bien que nous ayons réussi à revêtir les différents composants de stents rudimentaires, la couche de PDA de la face luminale du stent n'était pas satisfaisante dans ces premières expériences, probablement en raison d'une hydrophobicité trop importante du PTFE et de la pénétration insuffisante de la solution de dopamine au sein du stent. Nous avons alors décidé de vaincre cette hydrophobicité en forçant le flux au sein du stent en utilisant une pompe à flux (Allegro I, Kd Scientific, MA, USA). Le principe est détaillé dans la **Figure 45** : la pompe péristaltique imposait un flux de PDA à 2 mg/ml unidirectionnel à 400 ml/minute dans des tubes en silicone où des stents étaient placés en série. Cette fonctionnalisation était réalisée pendant 18h. Les résultats macroscopiques de ce revêtement étaient meilleurs qu'avec la technique du dip-coating simple. Nous avons raffiné cette technique en appliquant cette fois ci un flux bidirectionnel avec des séquences de flux de 30 secondes alternativement pendant 18h. C'est cette dernière méthode que nous avons gardée depuis pour les stents couverts.

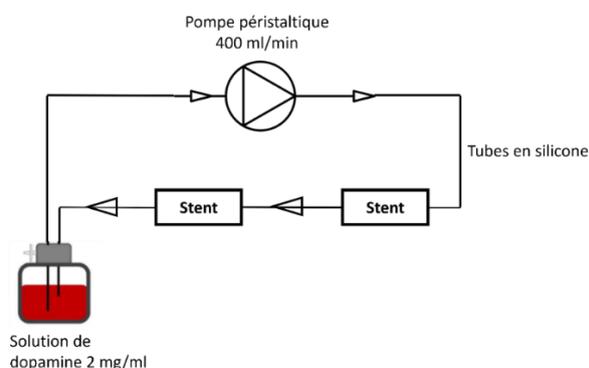


Figure 45. Schéma expérimental de fonctionnalisation à la dopamine sous flux à la dopamine de stents placés en série



Figure 46. Aspect de la face luminale du PTFE de stents rudimentaires fonctionnalisés à la dopamine en microscopie VHX (grossissement x20).

Noter l'aspect plus marqué du coating en utilisant un flux bi-directionnel.

B- Stents Papyrus

Une fois cette méthode de revêtement de stents couverts standardisée, nous avons pu la tester sur des stents de l'industrie, en vue d'une application ultérieure *in vivo*. Pour cela, des stents coronaires couverts PK Papyrus (CoCr et polyuréthane, Biotronik, Berlin, Allemagne) ont été utilisés. Le polyuréthane est un matériau hydrophobe utilisé dans de très nombreux domaines pour ses caractéristiques isolantes et hydrophobes. Le principal intérêt de leur utilisation dans des dispositifs endovasculaires réside dans l'obtention d'un meilleur profil et flexibilité des stents par rapport à des stents en PTFE nécessitant une armature métallique interne et externe.

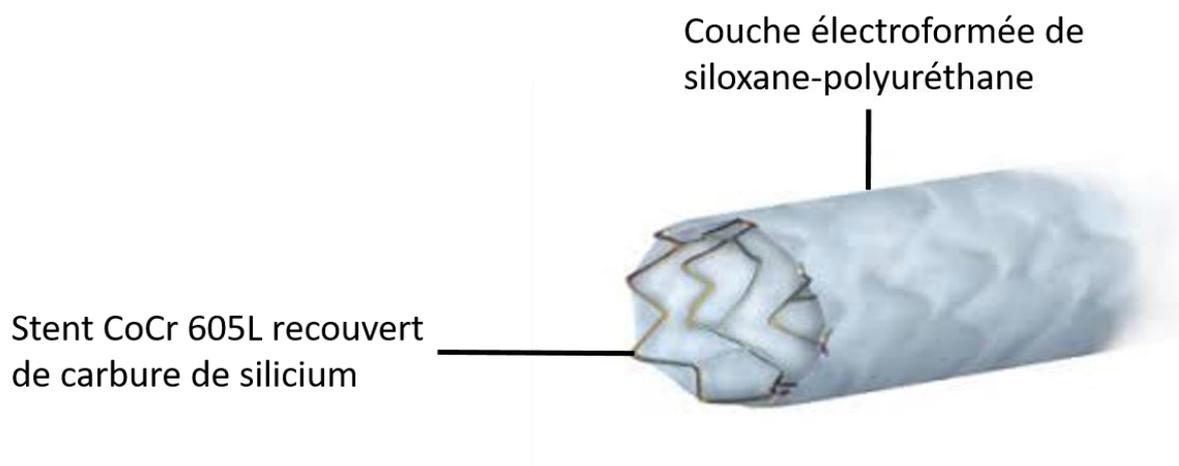


Figure 47. Composants du stent Papyrus PK

Ces stents ont été fonctionnalisés à la dopamine en utilisant la pompe à flux bidirectionnel selon la méthode précédemment décrite. Ce procédé a permis un recouvrement homogène du stent et du polyuréthane en analyse VHX (**Figure 48**).



Figure 48. Aspect microscopique des faces lumineales et abluminale d'un stent PK Papyrus après flux bidirectionnel de PDA à 2 mg/ml pendant 18h.

Une analyse plus poussée en microscopie électronique à balayage a été conduite sur deux stents PK Papyrus, un non fonctionnalisé (nu) et l'autre fonctionnalisé à la PDA. Ces analyses permettent de retrouver la présence de PDA sur les deux faces du revêtement de PU du stent fonctionnalisé.

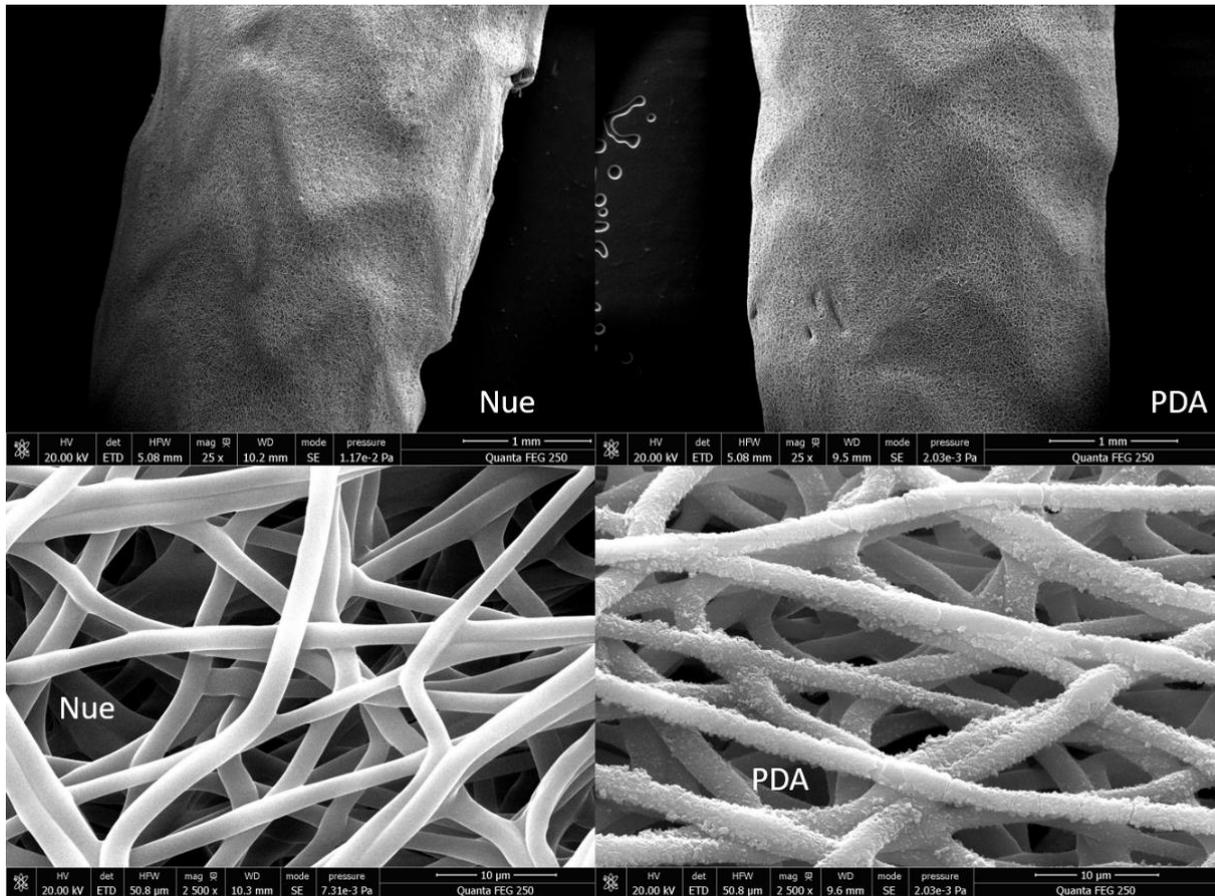


Figure 49. Aspect en MEB de stents Papyrus PK nu et fonctionnalisés à la dopamine en grossissements x 25 (haut) et x 2500 (bas).

Noter la présence d'amas de PDA sur la face externe fonctionnalisée par rapport à la surface nue des fibres de polyuréthane.

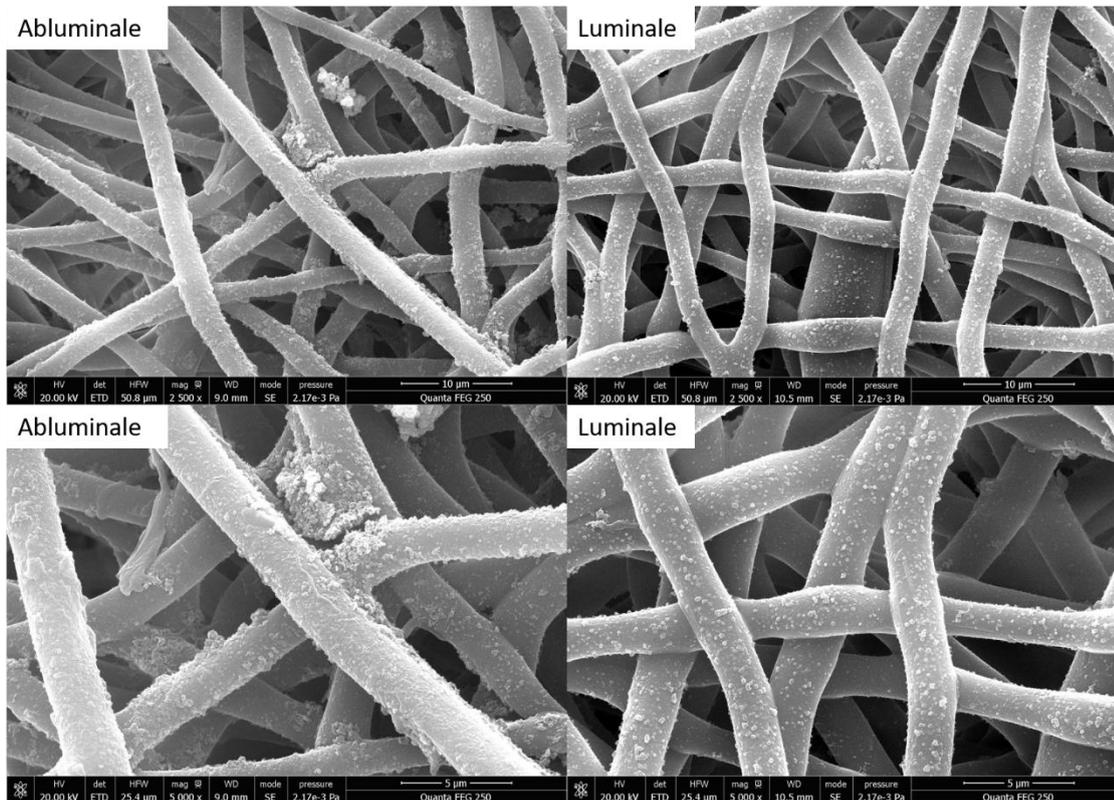


Figure 50. Aspect en MEB de stents Papyrus PK nu et fonctionnalisés à la dopamine en grossissements x 2500 (haut) et x 5000 (bas).

Noter la présence d'amas de PDA sur les deux faces fonctionnalisées.

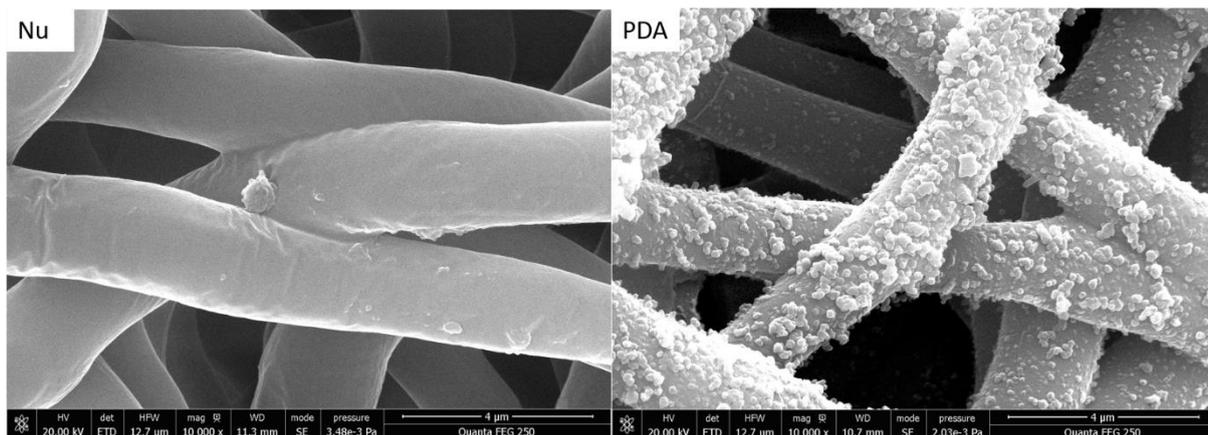


Figure 51. Aspect en MEB de la face luminale de stents Papyrus PK nu et fonctionnalisés à la dopamine en grossissements x 10 000.

IV. EVALUTION DE LA BIOCOMPATIBILITE DES SURFACES COATEES *IN VIVO*

Après ces résultats *in silico* et *in vitro*, l'étape suivante a été de choisir un peptide afin de fonctionnaliser des dispositifs *in vivo* en conditions saines (vaisseau artériel natif) ou en conditions pathologiques (vaisseau artériel anévrysmal). Il a fallu faire un compromis entre performances *in vitro* et conformation tridimensionnelle, les peptides linéaires ayant notre préférence car plus faciles à industrialiser et dont les contrôles qualité sont plus aisés.

C'est le peptide SP1072 qui a été retenu. Il s'agit d'un peptide linéaire codant pour les acides aminés Tyr 107 - Glu 122 avec un groupement azide en position C-terminale, mimétique du domaine IgL1A du CD31 (**Figure 52**).

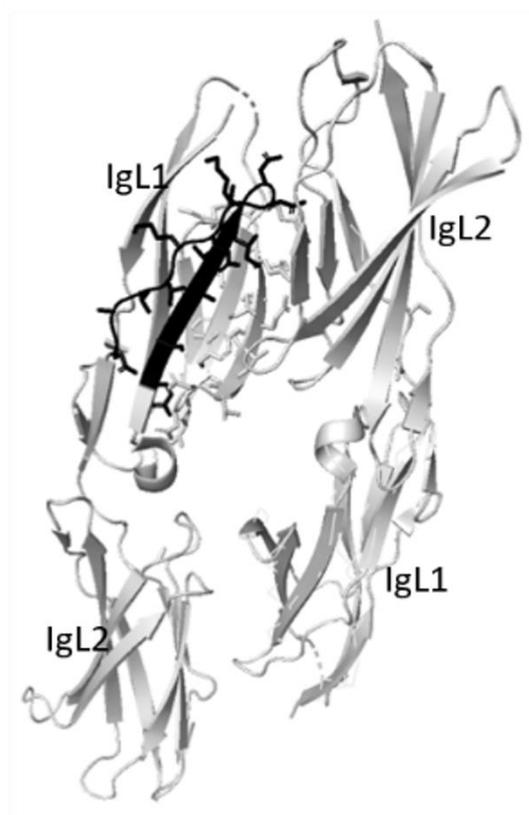


Figure 52. Structure tridimensionnelle du peptide SP1072 mimant le domaine IgL1A du CD31

Préalablement à leur implantation chez l'animal, des flow-diverters (Sinomed) et des stents nus en CoCr (Sinomed) ont été fonctionnalisés avec le peptide SP1072. Afin de faire la preuve de concept, nous avons décidé d'évaluer ces dispositifs dans de petits groupes d'animaux permettant d'évaluer la versatilité de notre méthode de fonctionnalisation avec un peptide mimant le domaine 1 extracellulaire du CD31.

Le choix des modèles animaux devait tenir compte des paramètres suivants :

- La rhéologie et le système de coagulation devant être proches de ceux de l'Homme
- La morphologie des anévrysmes expérimentaux devait mimer le plus possible la pathologie anévrysmale cérébrale de l'Homme (anévrismes sacciformes)
- L'hémodynamique des anévrysmes sacciformes expérimentaux devait être proche des lésions observées chez l'Homme
- La compatibilité des dimensions des dispositifs d'étude (longueur, diamètre) avec celles de dispositifs utilisés en pratique clinique
- La compatibilité des dimensions artérielles des modèles animaux avec une potentielle application chez l'Homme

En prenant en compte tous ces facteurs, le lapin New Zealand (male, 12 semaines, 3 kg) a été retenu comme modèle de choix pour l'évaluation des flow-diverters et des stents nus en CoCr. Au vu de problèmes logistiques (travaux dans l'animalerie de l'unité U1148 à Bichat) les études sur le lapin ont eu été supervisées par les Dr. Ran SONG et Zhongcheng PAN à l'institut Sinomed à Shanghai (Chine) (PL JC22-0005).

IV.1. Flow-diverters en nitinol

Le but des expérimentations animales était de déterminer :

- 1- La biocompatibilité des dispositifs dans un vaisseau sain (aorte abdominale de lapin) en évaluant l'agrégation plaquettaire et l'endothélialisation de ces dispositifs.
- 2- La biocompatibilité des dispositifs en situation pathologique (anévrisme sacciforme de l'artère sous-clavière droite chez le lapin) en évaluant la perméabilité, l'agrégation plaquettaire et l'endothélialisation de ces dispositifs.

La perméabilité était évaluée par artériographie à différents intervalles de temps. L'endothélialisation et l'agrégation plaquettaire étaient évaluées par coupes sériées histologiques et par microscopie électronique à différents intervalles de temps. Le schéma expérimental est explicité dans la **Figure 53**.

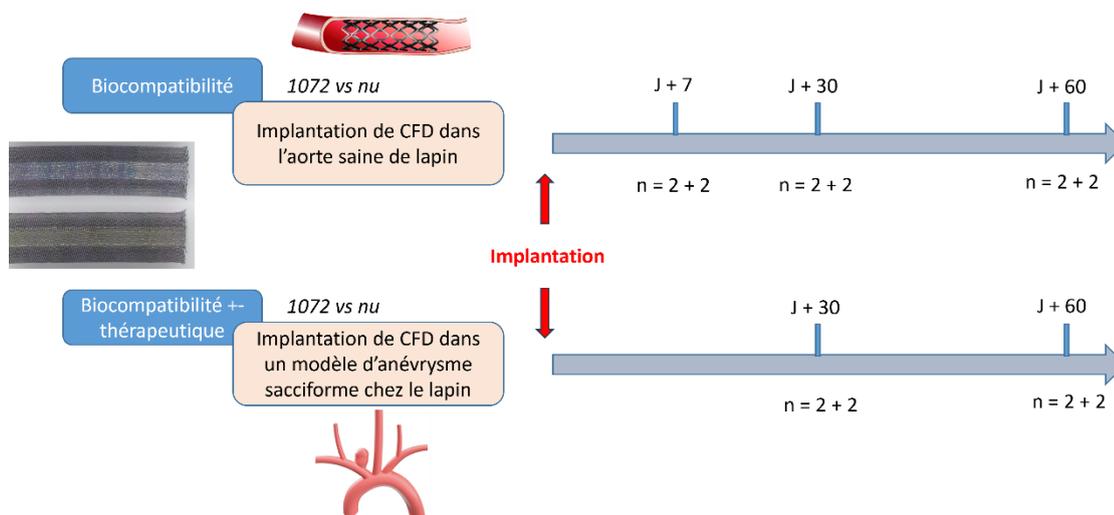


Figure 53. Schéma expérimental de l'implantation de flow-diverters nus ou fonctionnalisés avec le peptide SP1072 en conditions saines et pathologiques chez le lapin.

Les flow-diverters (nitinol, 2.5mm de diamètre x 40mm Sinomed, Chine) ont été fonctionnalisés selon la technique précédemment décrite en I.3-1. Ces dispositifs étaient stérilisés par oxyde d'éthylène pendant 30 minutes et rengainés dans leurs lanceurs en conditions stériles sous hotte. Ces dispositifs étaient alors insérés sous anesthésie générale (Isoflurane 3%) sous contrôle artériographique dans l'aorte abdominale ou dans un modèle sacciforme d'anévrisme du tronc artériel brachio-céphalique chez des lapins adultes (New Zealand White Rabbit, 3 kg). Les animaux recevaient une bi-antagrégation

plaquettaire orale (aspirine 5mg/kg + clopidogrel 5mg/kg) dès J-3 qui était poursuivie pendant tout le protocole.

IV.1.a. Aorte saine

Procédure : Les lapins étaient anesthésiés par voie intraveineuse (induction par Sutura IM 6mg/kg + entretien Isoflurane 1.5%) et intubés. Une injection de Ceftriaxone était réalisée (0.1g/kg, IM). Une dénudation de l'artère fémorale droite était réalisée après aseptie du champ opératoire. Un introducteur 6F était placé par voie rétrograde et une héparinothérapie était administrée à la dose de 150 UI/kg. Un guide 0.014 était placé dans l'aorte abdominale et le dispositif largué dans l'aorte abdominale sous-rénale sous contrôle artériographique. L'artériotomie était alors fermée par trois points de Prolène 8/0 après manœuvres de purge. L'animal était alors réveillé et recevait les traitements analgésiques adaptés. Les stents étaient explantés à J +7, J +30 et J + 60 après implantation sous anesthésie générale (n = 2 / groupe). Les prélèvements étaient immédiatement fixés à la PFA 4% à 4°C et soit inclus en résine de méthacrylate en vue de leur coupe pour coloration (coupes axiales, coloration HES) soit déshydratés par différents bains d'EtOH (50 à 100%) préalablement à leur analyse en microscopie électronique (coupes longitudinales du segment artériel contenant le dispositif).

Résultats : Les analyses en MEB des dispositifs implantés ont permis de mettre en évidence un recouvrement homogène, précoce (dès J +7) et pérenne de la face luminale du flow-diverter fonctionnalisé avec le SP1072, l'ensemble étant associé à une absence d'agrégation cellulaire. Ces constatations se traduisaient sur le plan histologique par la présence d'une néo-intima fine sans invasion leucocytaire ou plaquettaire. Ces résultats ont été confirmés à des temps plus tardifs d'observation à J+30 et J+60 après implantation. A contrario, les stents nus présentaient une endothélialisation imparfaite, avec la présence d'une agrégation plaquettaire et de thrombus importants sur la face luminale dès J+7 en MEB (**Figures 54-56**). Cette endothélialisation imparfaite peut être responsable de la persistance de flux à travers les mailles serrées du stent. De plus, l'interprétation des coupes histologique retrouvait une néo-intima épaisse et hétérogène contenant des hématies et des leucocytes au niveau de la face luminale dès J + 7, persistant jusqu'au temps d'observation le plus tardif J + 60 (**Figures 57-59**).

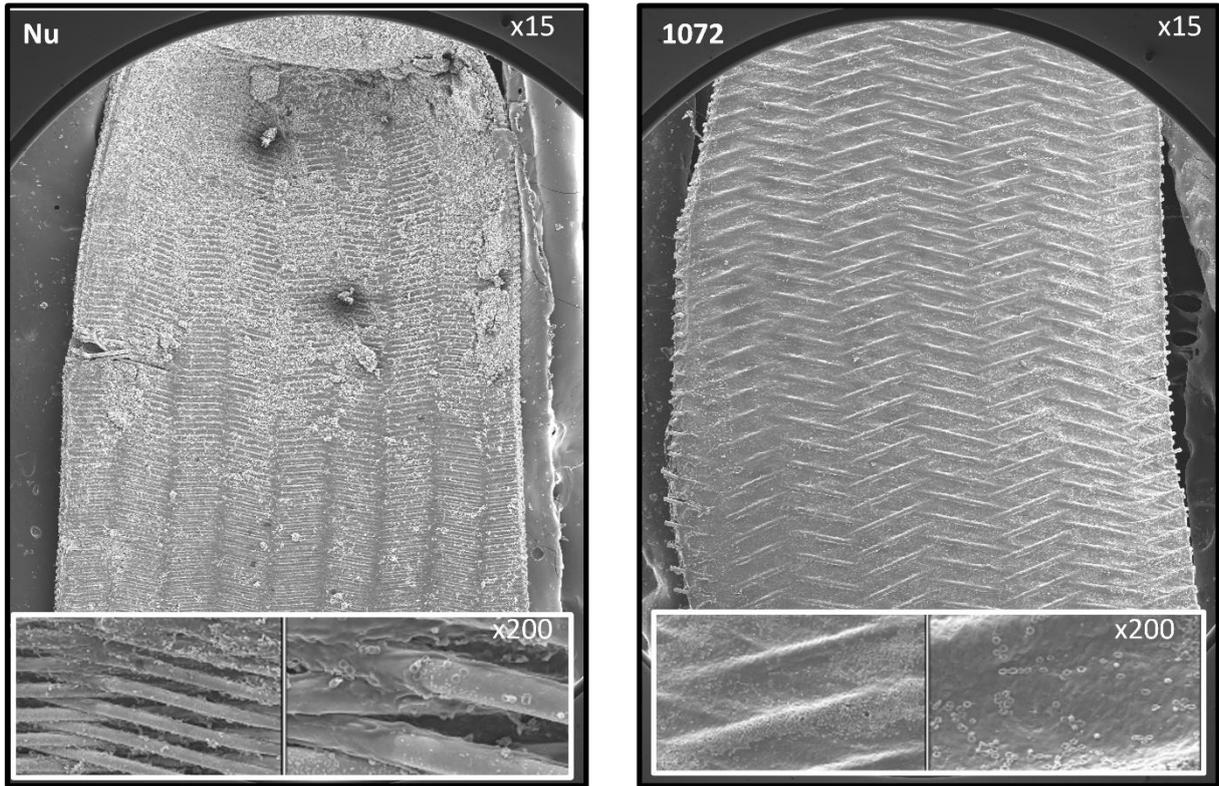


Figure 54. Aspect en MEB à J + 7 après implantation de FD nu et fonctionnalisé avec le peptide SP1072 dans l'aorte abdominale saine de lapin.

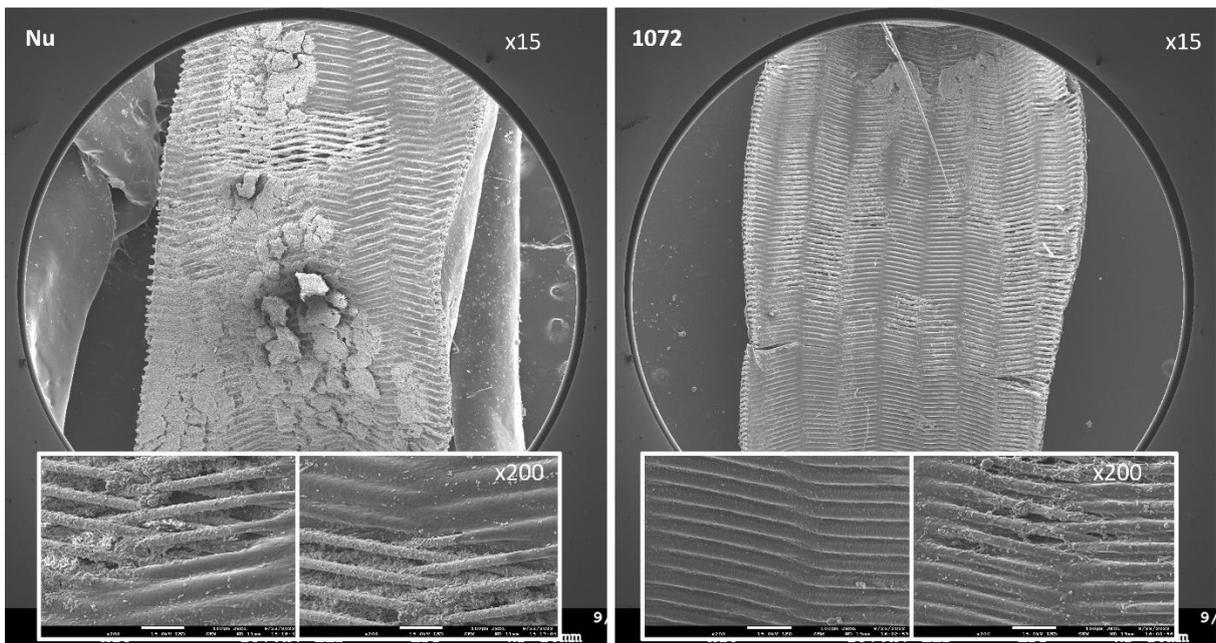


Figure 55. Aspect en MEB à J + 30 après implantation de FD nu et fonctionnalisé avec le peptide SP1072 dans l'aorte abdominale saine de lapin.

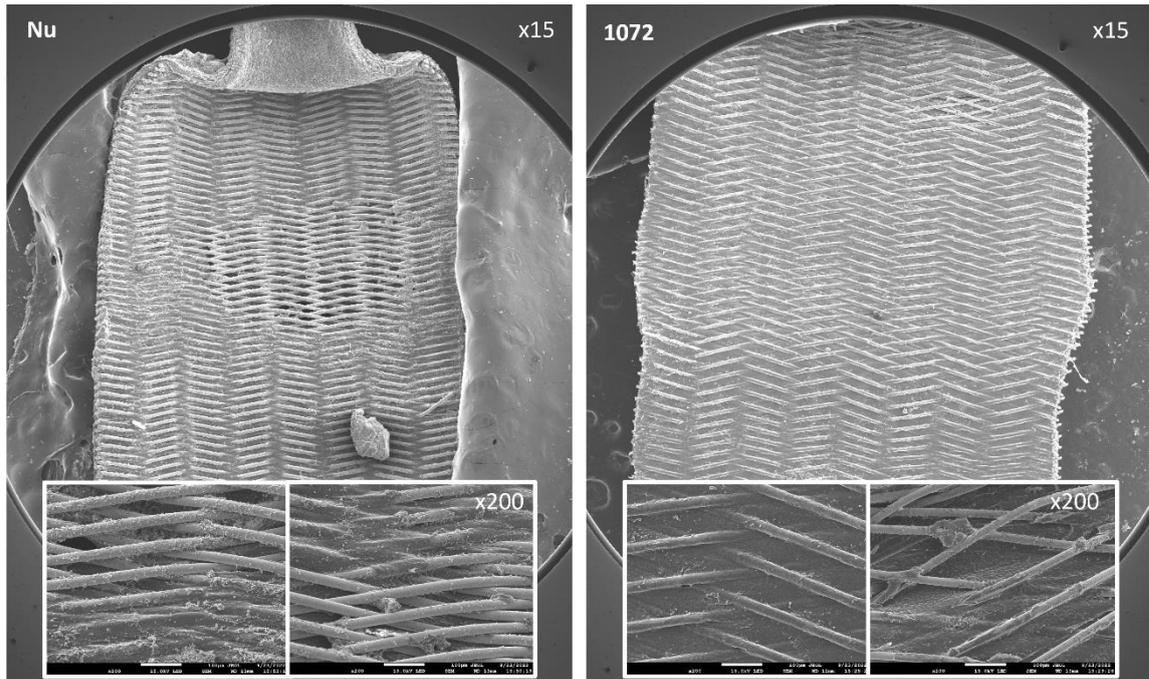


Figure 56. Aspect en MEB à J + 60 après implantation de FD nu et fonctionnalisé avec le peptide SP1072 dans l'aorte abdominale saine de lapin.

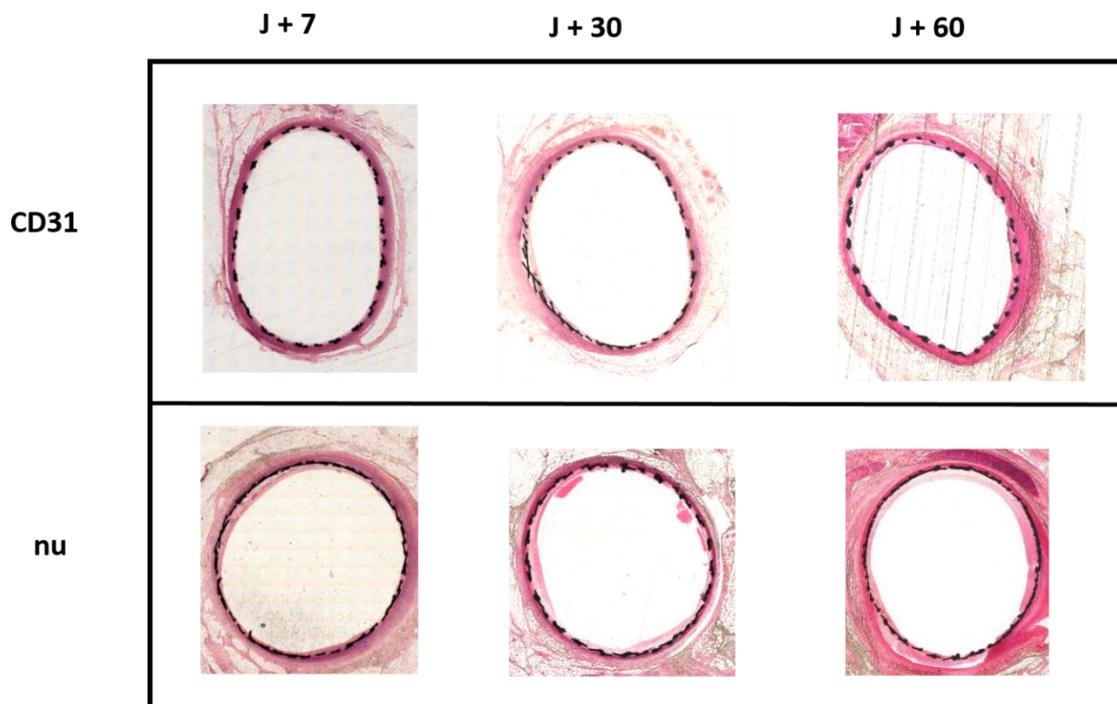


Figure 57. Coupes histologiques transversales d'aorte abdominale sous-rénale de lapin après implantation de flow-diverters fonctionnalisés au SP1072 ou non (coloration HES, x 5)

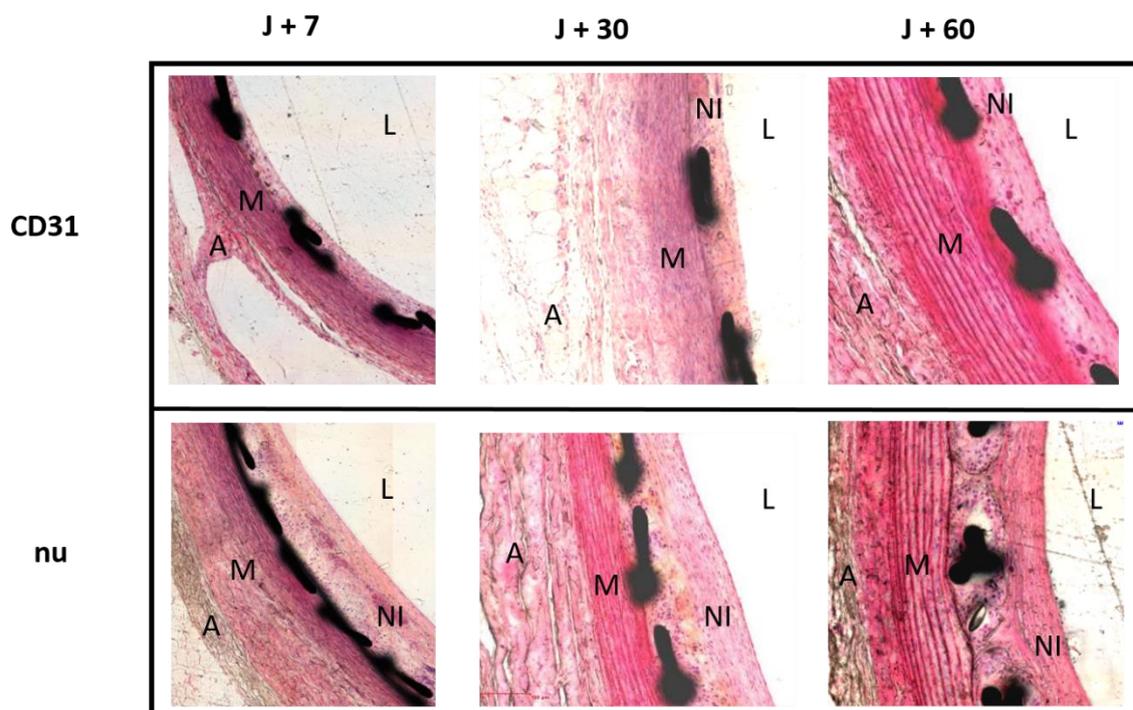


Figure 58. Coupes histologiques transversales d'aorte abdominale sous-rénale de lapin après implantation de flow-diverters fonctionnalisés au SP1072 ou nus (coloration HES, x 10).

A : adventice, L : lumière aortique, M : media, NI : néo-intima.

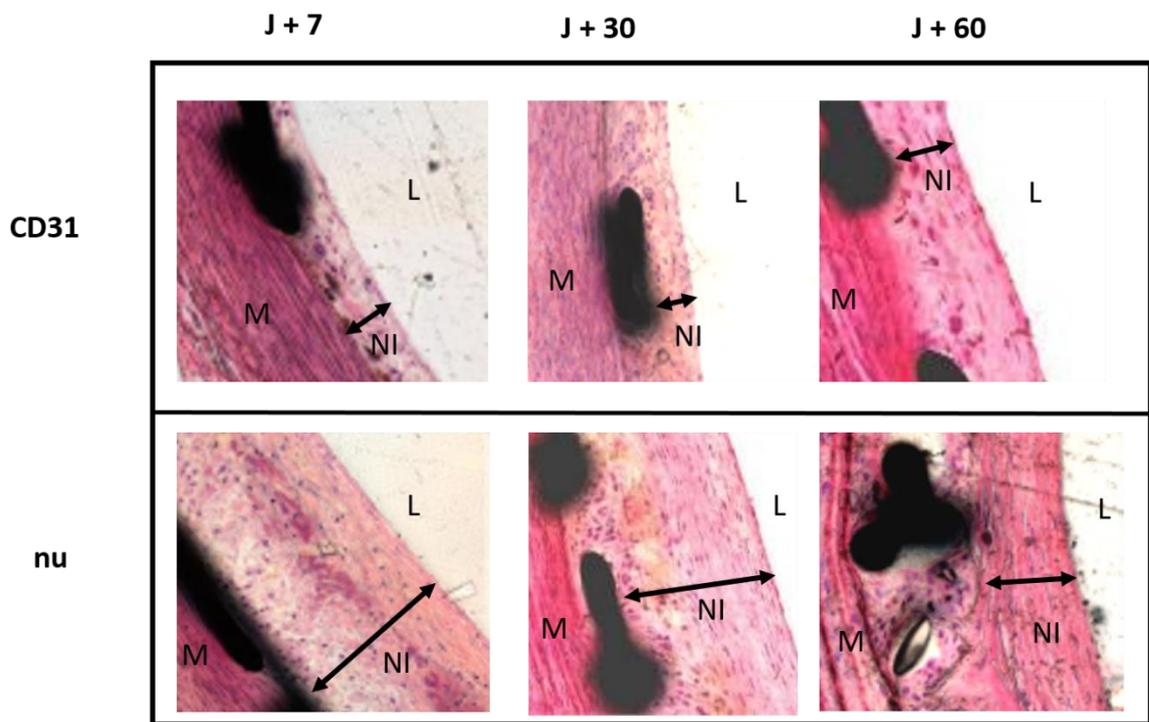


Figure 59. Coupes histologiques transversales d'aorte abdominale sous-rénale de lapin après implantation de flow-diverters fonctionnalisés au SP1072 ou nus (coloration HES, x 20).

A : adventice, L : lumière aortique, M : media, NI : néo-intima.

IV.1.b. Modèle d'anévrisme sacculaire à l'élastase

Procédure : Les flow-diverters étant utilisés en pratique clinique pour traiter les anévrismes intracrâniens (de morphologie sacciforme), un modèle d'anévrisme sacculaire de la carotide commune droite a été mis en place chez le lapin New Zealand (3 kg) par ligature proximale et infusion intra-artérielle d'élastase pancréatique porcine (75 U, Type I, Sigma Aldrich) pendant 20 minutes via une cervicotomie droite. La procédure avait lieu sous héparinothérapie efficace (200 U/Kg) et antibioprophylaxie (Ceftriaxone, 0.3g/kg). L'implantation de flow-diverters avait lieu 15 jours plus tard par la technique précédemment décrite en A. Après implantation, les animaux étaient alors réveillés et recevaient les traitements analgésiques adaptés. Les stents étaient explantés à J+7, J+30 et J+60 après implantation sous anesthésie générale (n = 2 / groupe). Les prélèvements étaient immédiatement fixés à la PFA 4% à 4°C et soit inclus en résine de méthacrylate pour analyse histologique (coupes axiales, coloration HES) soit déshydratés par différents bains d'éthanol (EtOH, de 50 à 100%) préalablement à leur observation en analyse en microscopie électronique (coupes longitudinales du segment artériel contenant le dispositif médical).

Résultats : Les artériographies réalisées à J+7, J+30 et J+60 confirmaient la perméabilité des dispositifs à tous les temps de l'étude. Toutefois, l'analyse histologique était difficilement interprétable du fait du mauvais placement de stent dans 2 cas sur 6 et du fait de l'absence de développement d'anévrisme dans 2 autres cas.

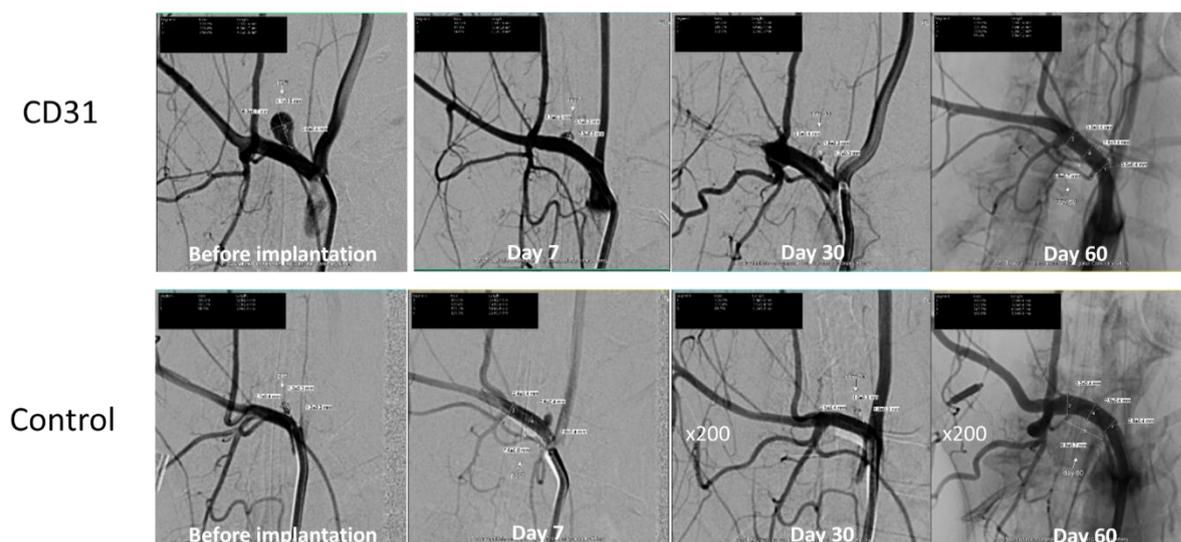
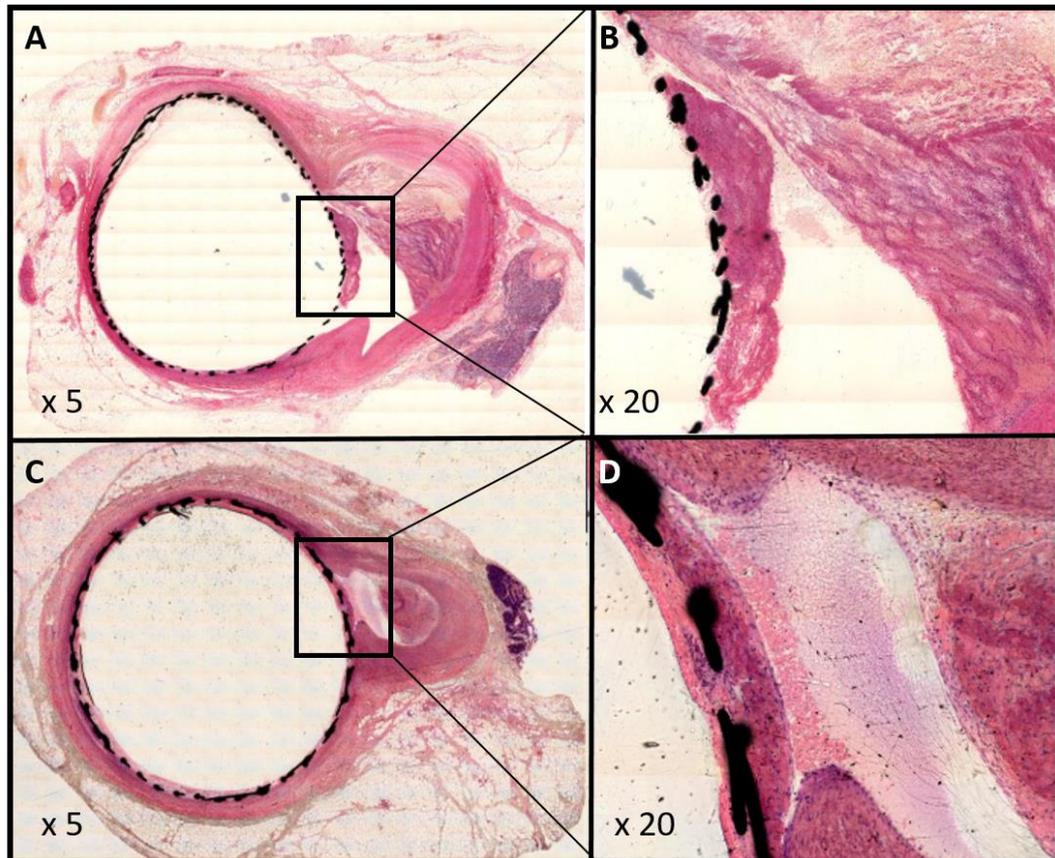


Figure 60. Artériographies sériées. Exclusion des anévrismes sacciforme du la carotide commune droite et perméabilité satisfaisante des flow-diverters.

Dès les observations les plus précoces (J+7), les flow-diverters du groupe SP1072 semblaient permettre un début d'organisation du thrombus avec un remodelage de la matrice extra-cellulaire au sein du sac anévrysmal. Ce thrombus anévrysmal ne contenait pas de fibrine fraîche ni d'hématies, témoignant d'une imperméabilité aux plaquettes et aux facteurs de la coagulation. Cette imperméabilité permet de supposer l'arrêt de la progression anévrysmale et de l'exclusion des phénomènes de fibrinolyse/fibrinofomation causant l'auto-entretien de l'inflammation des anévrismes sacciformes (137). Dans ce même groupe SP1072, il a été observé la formation d'une néo-intima compacte et riche en matrice-extra-cellulaire, indemne d'inflammation (sans leucocyte) ou de thrombose localisée. Concernant les flow-diverters nus (non fonctionnalisés), ces derniers étaient caractérisés sur le plan histologique par un thrombus circulant persistant à J+7, avec une infiltration marquée de leucocytes et de plaquettes (**Figure 61**).

Toutefois, le faible nombre de sujets expérimentaux n'a pas permis de réaliser des études comparatives sur le plan biologique ou histologique permettant d'affirmer de façon significative la supériorité des flow-diverters fonctionnalisés.

1072



nu

Figure 61. Coupes axiales de flow-diverters placés au sein d'anévrysmes sacciformes du TABC à J+7 (coloration HES). A, B. Coupes axiales d'un flow diverter fonctionnalisé au SP1072. Début d'organisation du sac anévrysmal avec remodelage matriciel et absence de sang frais dans le thrombus. Présence d'une néo-intima riche en matrice extra-cellulaire (violet) sans infiltration leucocytaire ni plaquettaire. C, D. Coupes axiales d'un flow diverter non fonctionnalisé. Absence d'organisation du thrombus et présence de sang frais au sein de l'anévrysmes. Infiltration par des leucocytes (points noirs), d'hématies (orange) et de plaquettes (rose).

IV.2. Stents non couverts en CoCr

Le but des expérimentations *in vivo* était de déterminer la biocompatibilité de stents en CoCr, nus ou avec différents revêtements, implantés dans l'aorte abdominale sous-rénale de lapin en évaluant l'agrégation plaquettaire et l'endothélialisation de ces dispositifs. Un total de 12 stents (3 par groupe expérimental : non fonctionnalisé, PDA seule, Sirolimus et 1072) a été implanté chez des lapins en position iliaque ou aortique. Chaque lapin recevait 4 stents (1 par groupe). Les temps d'analyses étaient J+7, J+14 et J+30 post-implantation. L'endothélialisation et l'agrégation plaquettaire étaient évaluées par coupes sériées histologiques et par microscopie électronique à balayage. Le schéma expérimental est explicité dans la **Figure 62**.

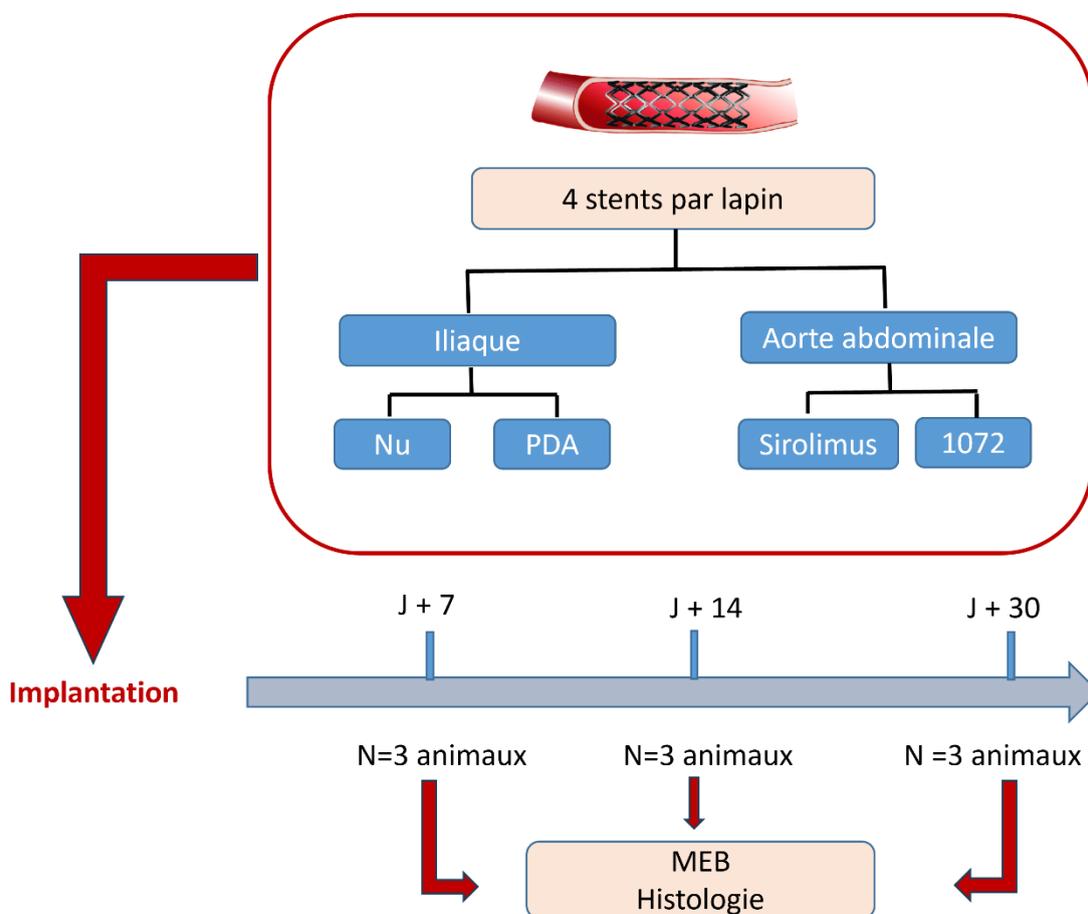


Figure 62. Flow-chart de l'implantation de stents CoCr *in vivo*.

Procédure : Des stents en CoCr (2.5mm de diamètre pour 30mm de long, Sinomed, Chine) ont été utilisés. Les stents dits PDA étaient fonctionnalisés avec la dopamine seule selon le protocole décrit en I.2 sans adjonction de DBCO ni de peptide. Les stents dits SP1072 étaient fonctionnalisés selon le protocole décrit en I.2. Les stents dits sirolimus étaient fonctionnalisés par le fabricant à la dose de 1,2 ug/mm². Tous les dispositifs étaient stérilisés par oxyde d'éthylène pendant 30 minutes. Tous les animaux de l'étude recevaient une bi-antiagrégation plaquettaire orale (acide acétylsalicylique 5 mg/kg + clopidogrel 5 mg/kg) débutée une semaine avant l'implantation et était poursuivie pendant toute la durée du protocole. Les lapins étaient anesthésiés par voie intraveineuse (induction Sutura IM 6 mg/kg + entretien Isoflurane 1.5%) et intubés. Une injection de Ceftriaxone était réalisée (0.1 g/kg, IM). Les artères fémorales étaient abordées chirurgicalement après asepsie du champ opératoire. Un introducteur 6F était placé par voie rétrograde de chaque côté et une héparinothérapie était administrée à la dose de 150 UI/kg par voie intraveineuse. Un guide 0.014 était placé dans l'aorte abdominale de chaque côté et les dispositifs largués dans l'iliaque primitive (1 nu et 1 PDA) ou dans l'aorte abdominale sous-rénale (1 sirolimus et 1 SP1072) sous contrôle artériographique. Les artériotomies étaient alors fermées par trois points de Prolène 8/0 après manœuvres de purge. L'animal était alors réveillé et recevait les traitements analgésiques adaptés. Les stents étaient explantés à J + 7, J + 14 et J + 30 après implantation sous anesthésie générale. Les prélèvements étaient immédiatement fixés à la PFA 4% à 4°C et soit inclus en résine de méthacrylate pour analyse histologique (coupes axiales, coloration HES) soit déshydratés par des bains successifs d'EtOH (50-100%) pour analyse en microscopie électronique à balayage (coupes longitudinales).

Résultats. Groupe nu : les échantillons explantés comportaient à J + 7 une couche luminale épaisse et friable avec la présence de thrombis macroscopiques. L'analyse en microscopie électronique des stents CoCr a mis en évidence une absence d'endothélialisation sur la face luminale des stents associée à la présence d'importants agrégats plaquettaires tant sur le stent que sur l'aorte stentée (**Figure 63**). L'analyse histologique a permis de déterminer que ces agrégats étaient composés d'érythrocytes et de plaquettes sur les analyses histologiques (**Figure 64**). A J + 14 et J + 30, la surface du stent et de la paroi aortique étaient endothélialisées avec une néo-intima épaisse (**Figures 65-68**) et une infiltration cellulaire légère à modérée composée d'érythrocytes, de leucocytes et de neutrophiles à J+30.

Groupe PDA : A J + 7, les stents montraient la présence de thrombis macroscopiques avec une endothélialisation de faible intensité et de très nombreux micro-thrombi constitués principalement de plaquettaires et d'érythrocytes (**Figures 63 et 64**). A J+14, la face luminale des stents était endothélialisée et on retrouvait de rares micro-thrombis, associés à une néo-intima épaisse (**Figures 65-66**). A J+30, les micro-thrombis étaient plus nombreux, avec une infiltration cellulaire

modérée à sévère composée de plaquettes et d'érythrocytes et la persistance d'une néo-intima épaisse (**Figures 67-68**).

Groupe Sirolimus : A J+7, il existait des micro-thrombis avec une endothélialisation imparfaite des stents, associée à un recouvrement par une couche épaisse de plaquettes et d'érythrocytes visibles en MEB et sur les coupes histologique (**Figures 63 et 64**). Aux temps intermédiaires et tardifs (J+14 et J+30), on observait une endothélialisation inégale avec la présence d'un néo-intima relativement fine à la surface du CoCr, associée de façon modérée à de micro-thrombis à J+14, faible à J+30 (**Figures 65-68**).

Groupe SP1072 : Au temps précoce (J+7), on notait de rares micro-thrombis avec la présence d'une néo-intima homogène et régulière, avec la présence de rares agrégats plaquettaires (**Figure 63**). Sur le plan histologique, il n'existait pas de micro-thrombis ni d'agrégation plaquettaire (**Figure 64**). Ces résultats étaient constants au cours du temps, avec la persistance d'une ré-endothélialisation homogène sans recrutement cellulaire aux temps plus tardifs (**Figures 65-68**). En d'autres termes, dès J+7, l'intégralité des surfaces métalliques n'était plus exposée au sang circulant avec un néo-endothélium constant d'allure non-thrombogène.

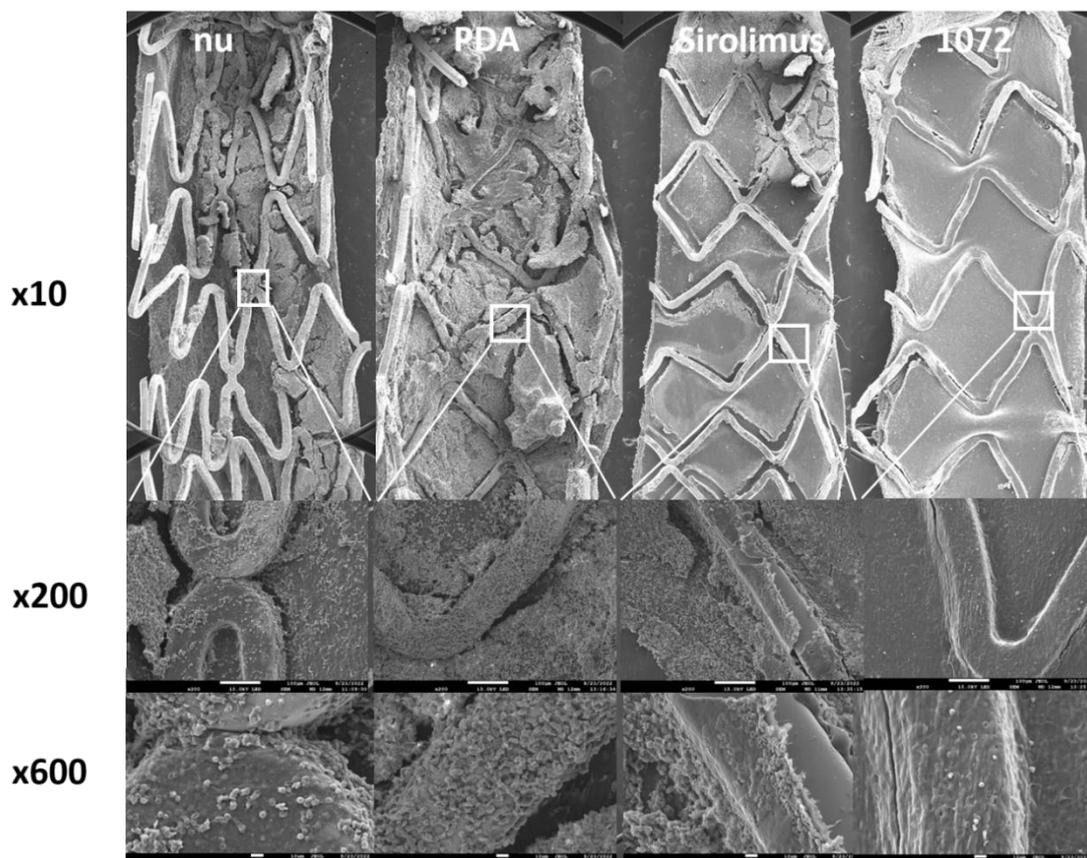


Figure 63. Analyse en MEB de coupes longitudinales artérielles contenant des stents en CoCr à J+7 à différents grossissements. Noter l'agrégation cellulaire importante à la surface du stent et l'absence d'endothélialisation dans les groupes nus et PDA. On note à plus fort grossissement l'endothélialisation incomplète dans le groupe sirolimus. Le stent SP1072 ne semble pas comporter de thrombose et présente une endothélialisation homogène sans exposition du matériel.

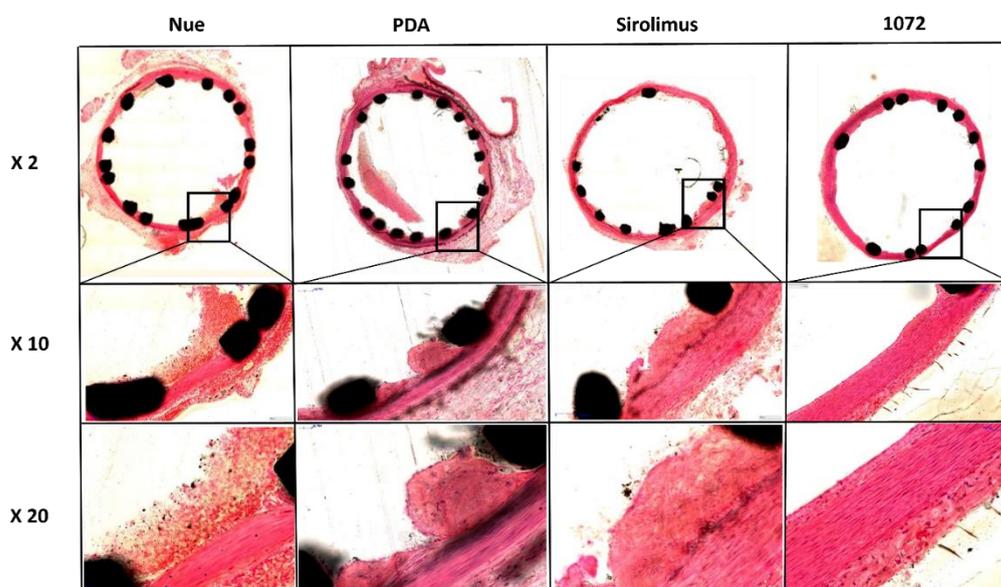


Figure 64. Analyse histologique (HES) de stents en CoCr à J+7 à x2, x10 et x20. Présence de thrombus intraluminal dans les groupes nus, PDA et sirolimus. Présence d'une néo-intima non organisée, épaisse et irrégulière dans le groupe sirolimus. Absence de thrombus dans le groupe SP1072

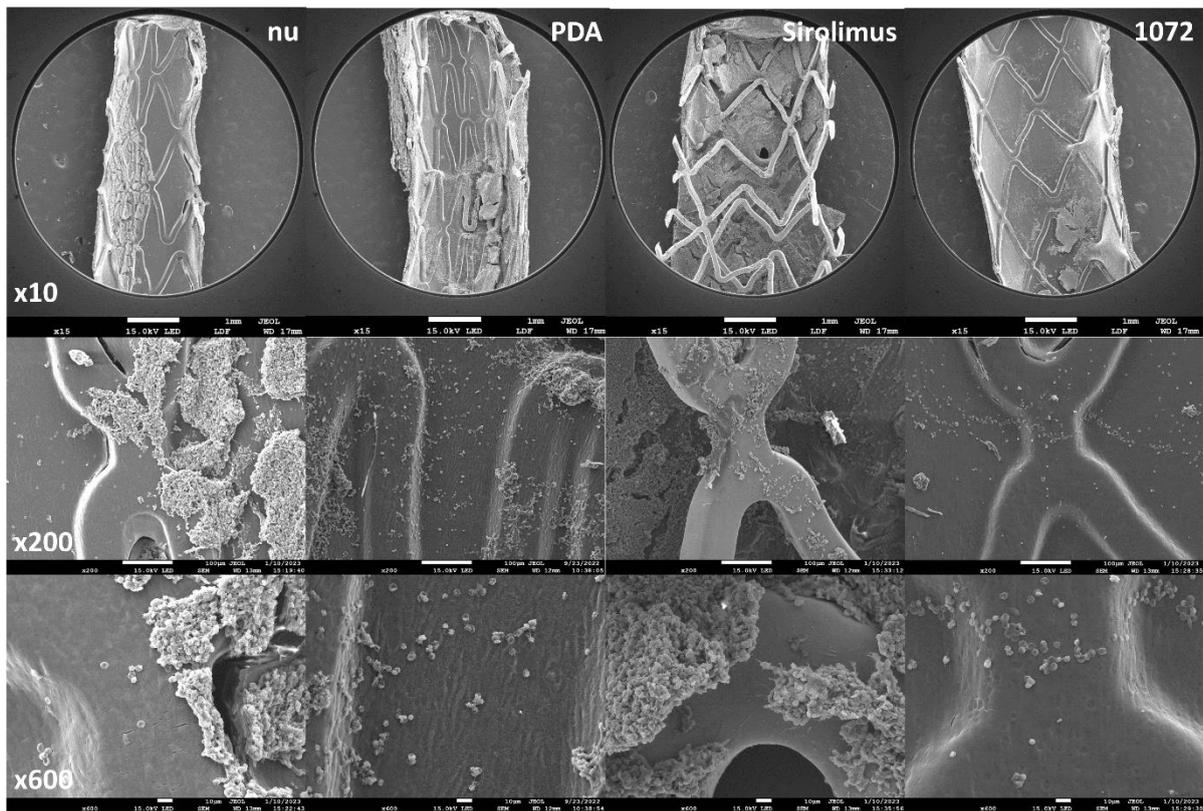


Figure 65. Analyse en MEB de coupes longitudinales artérielles contenant des stents en CoCr à J+14 à différents grossissements. Présence d'une endothélialisation dans tous les groupes d'études, sauf dans le groupe sirolimus où le stent n'est pas recouvert. Présence d'agrégation cellulaire importante à la surface du stent dans les groupes nus et sirolimus. Le stent SP1072 ne semble pas comporter de thrombose et présente une endothélialisation homogène sans exposition du matériel.

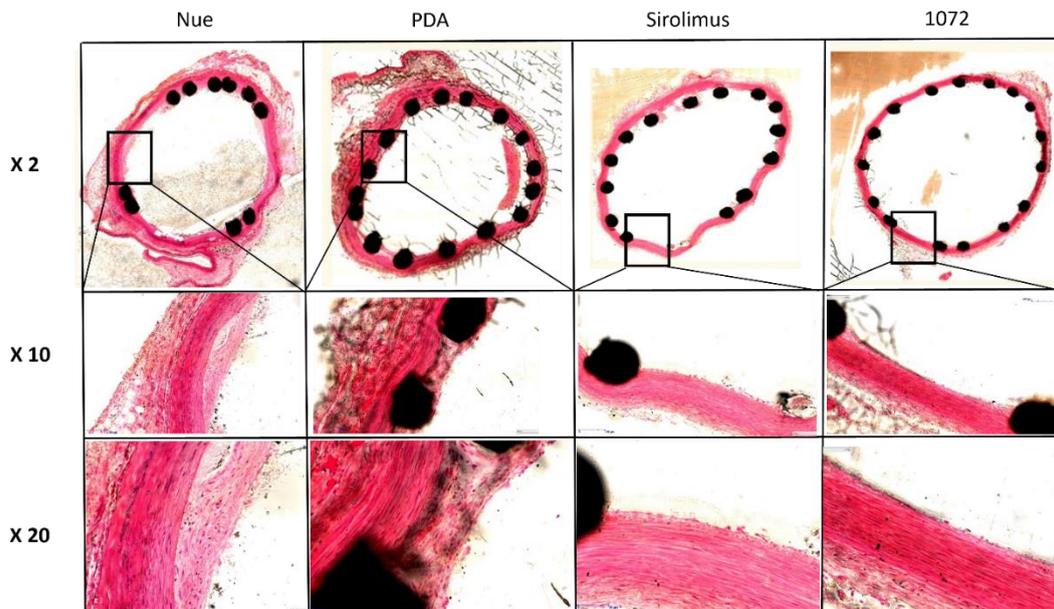


Figure 66. Analyse histologique (HES) de stents en CoCr à J+14 à x2, x10 et x20. Présence de microthrombis intraluminaux et présence d'une néo-intima épaisse dans les groupes nus et PDA. Présence d'une néo-intima plus fine dans les groupes sirolimus et SP1072.

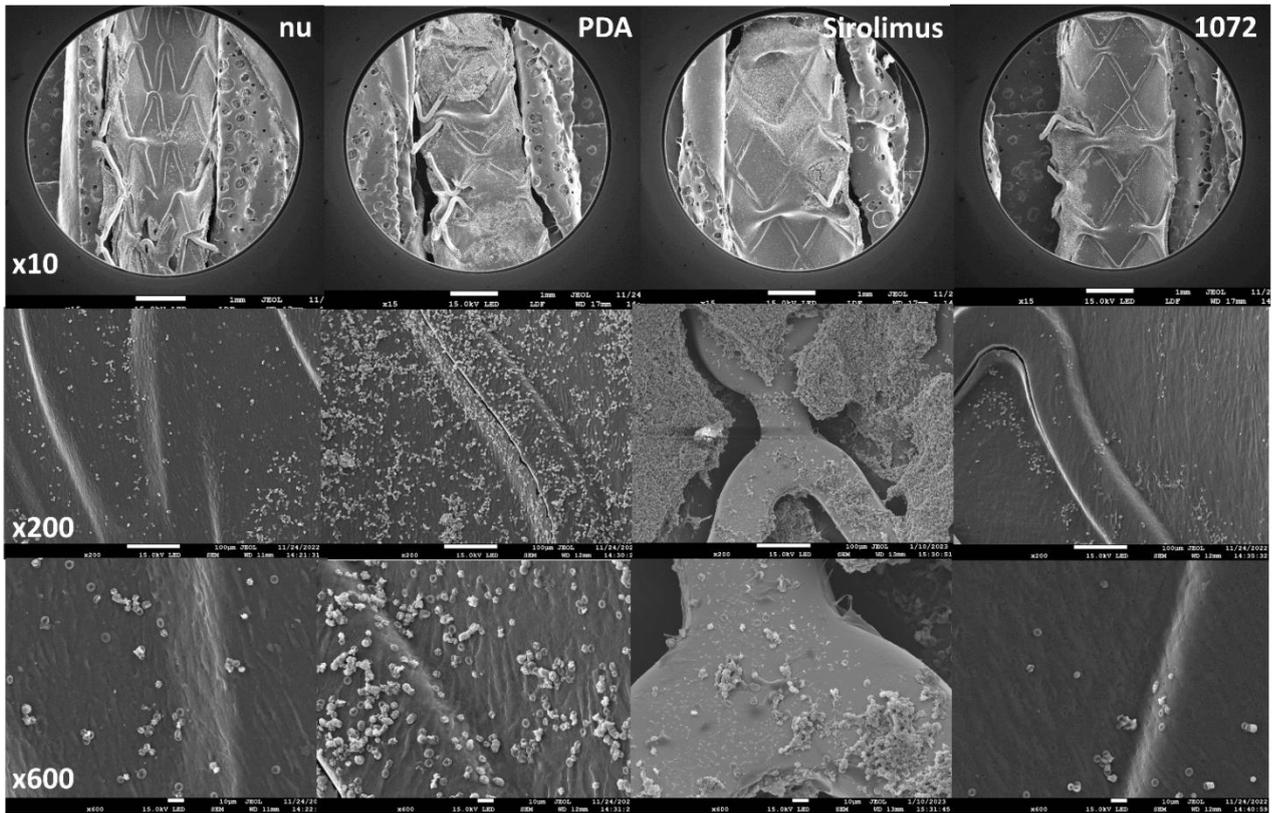


Figure 67. Analyse en MEB de coupes longitudinales artérielles contenant des stents en CoCr à J+30 à différents grossissements.

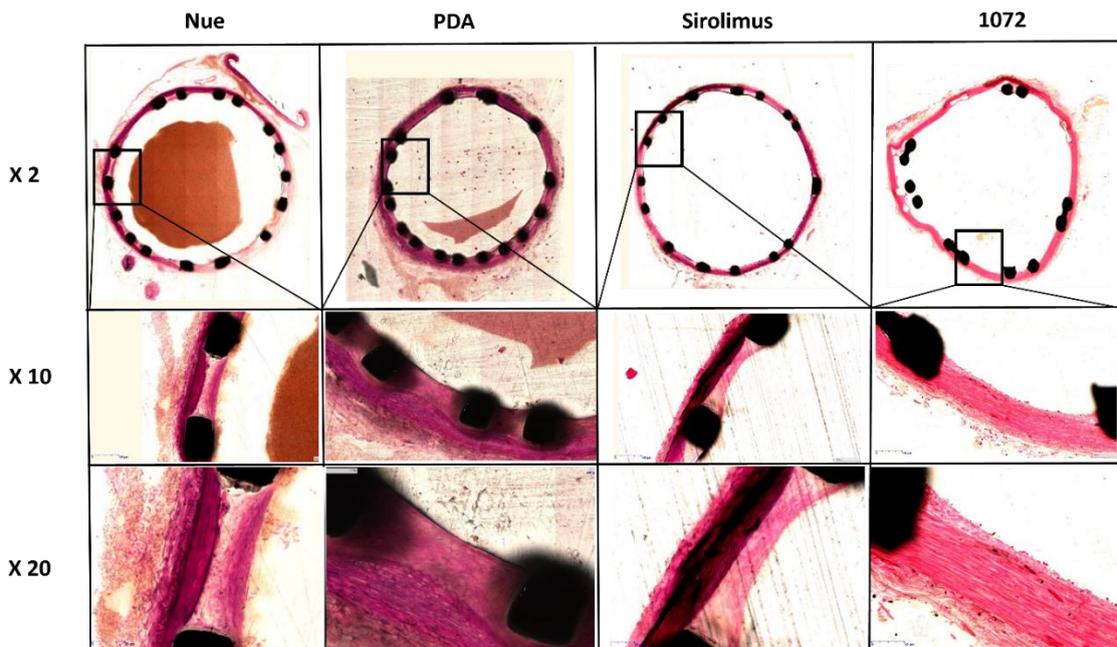


Figure 68. Analyse histologique (HES) de stents en CoCr à J+30 à x2, x10 et x20. Disparition des microthrombis, et présence d'une néo-intima épaisse dans les groupes nus et PDA. Présence d'une néo-intima plus fine dans le groupe sirolimus. Néo-intima virtuelle dans le groupe SP1072.

D. DISCUSSION

I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET TRANSLATIONNEL DU PROJET

I.1. Pourquoi travailler à un revêtement de stent aujourd'hui ?

Les taux importants de RIS des stents nus en pathologie coronarienne ou artérielle périphérique est à l'initiative du développement croissant de thérapies médicamenteuses ciblées sur les mécanismes participants à la RIS décrits dans l'introduction. L'adjonction de ces molécules bioactives nécessite une modification de la surface des dispositifs implantables, étape nommée fonctionnalisation.

Intérêts du revêtement : L'adjonction d'un revêtement à la surface des stents, en parallèle de l'amélioration de la structure et de la composition des alliages métalliques des dispositifs endovasculaires (comme l'électro-polissage), a été pensée pour diminuer la réaction inflammatoire liée à l'implantation des stents nus dès 2002 par Palmaz (138). Plusieurs traitements de surface ont alors été développés afin d'augmenter la biocompatibilité des dispositifs, comme l'or (139), le carbide de silicone (140), l'héparine (141) ou la phosphorylcholine (142) sans mettre en évidence de supériorité significative dans les études cliniques par rapports aux dispositifs nus, et ce malgré des résultats pré-cliniques encourageants. La recherche s'est alors tournée vers l'application sur la face artérielle de principes actifs limitant la prolifération de cellules musculaires lisses par le biais de polymères. L'utilisation de ces derniers, jouant un rôle-clé d'espaceur entre l'alliage métallique et le principe actif, introduisit le concept fondateur de copolymérisation (25). Ces polymères permettent la libération contrôlée au cours du temps du principe actif. Les polymères nécessitent de respecter un cahier des charges bien précis. Ils doivent ainsi être biocompatible, ne pas interagir avec le principe actif en limitant ou en annihilant son activité, doivent permettre une pharmacocinétique satisfaisante du principe actif, être biologiquement inerte après élution du principe actif et stable au cours du temps.

Stents avec polymères : Les stents actifs de 1^{ère} génération étaient composés de stents en acier inoxydable recouvert d'un polymère libérant par élution le principe actif. Le stent Cypher (Cordis, CA, USA) et le Taxus (Boston Scientifics, MA, USA) ont été introduits sur le marché en 2003. Le Cypher comportait une couche de parylène avec un polymère composé d'acétate de polyethylene-co-vinyl (PEVA) et de poly-n-butyl methacrylate (PBMA) permettant la libération de sirolimus (143). Le Taxus quant à lui, comportait un polymère de poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene) (SIBS) avec un revêtement de paclitaxel (144). Toutefois, l'observation de taux de thrombose tardive et très tardive non négligeables ont conduit au développement des stents actifs de seconde génération. Les améliorations techniques se sont concentrées sur l'aspect matériel du dispositif avec la modification de l'épaisseur des mailles, la conformabilité ou encore la flexibilité de l'alliage formant le stent. La

diminution des mailles a été permise par la transition vers une plateforme de CoCr ou de platine-chrome. De nouveaux polymères, plus biocompatibles comme l'acide polylactique (PLA), le poly(vinylidènefluorure-cohexafluoropropène) (PVDF-HFP) et le polyvinylpyrrolidone (PVP) ont été développés aux côtés de nouveaux composés thérapeutiques comme le zotarolimus, l'everolimus et le novolimus (145) .

Désavantages des polymères permanents: La permanence des polymères *per se* a été incriminée dans la chronicisation de l'inflammation au site implanté, perdurant bien au-delà de l'élution complète des drogues dans le contexte des stents actifs (59,146), se traduisant cliniquement par la survenue de complications tardives. Bien que considéré comme stable, la dégradation du polymère de PMBA a été rapporté (147), et les produits solubles issus de cette dégradation peuvent induire une altération de la fonction endothéliale ainsi que l'apoptose des cellules musculaires lisses. Bien que le défaut d'endothélialisation ait été amélioré sur les stents actifs de seconde génération par rapport à la précédente (148), la fréquence de néo-athérosclérose au sein de ces dispositifs n'a pas diminué de façon drastique (43).

Polymères biorésorbables: Dans le cas des stents actifs, le polymère a été, là aussi, mis en cause dans l'inflammation. L'absence d'endothélialisation complète et la persistance de polymères permanents causant des réactions à corps étranger (149) a conduit au développement de polymères biorésorbables comme les acides poly(D,L)lactique (PDLLA), poly(lactide-co-glycolique) (PLGA), et poly-L-lactique (PLLA). Ces polymères biorésorbables semblent montrer *in vitro* de meilleures performances en termes de fonction endothéliale, de croissance de cellules musculaires lisses et de thrombogénicité comparativement aux des polymères dit « permanents » comme le PEVA et le PBMA (150–152). Ces dispositifs, qui sont principalement utilisés pour des lésions coronaires, ont montré leur efficacité par le biais d'une réduction du taux de thrombose très tardive par rapports aux stents actifs au sirolimus utilisant un polymère durable (153,154) ,comme le stent Orsiro (152,155) .

Polymère	Structure	Caractéristiques
<i>Polymères non-résorbables</i>		
Parylène C	Matériel cristallin dérivé de monomères de poly-paraxylylene après substitution d'un atome de chlore pour un hydrogène	Création d'un film nanométrique, diminution de la perméabilité à l'eau et aux gaz, excellentes propriétés électriques
PBMA	Liquide transparent hautement hydrophobe et durable	Biocompatible avec des éluions longues, présente des felures à hautes concentration de principe actif (PC), utilisé en pratique avec du PEVA
PEVA	Copolymère composé d'acétate de vinyl	Libération rapide de PC (50% à 24h). Est utilisée en pratique avec du PBMA pour une libération contrôlée de PC.
SIBS	Elastomère thermo-plastique, auto-polymère de polyisobutylene aux propriétés proches du silicone ou polyuréthane.	Soluble, peut être appliqué par spray. Stable sur les plans enzymatiques et hydrolytiques, faible réaction à corps étranger
Phosphorylcholine	Polymère hydrophile	Semblable à la structure de phosphorylcholine présente dans la membrane cellulaire des érythrocytes
PVDF-HFP	Co-polymère hydrophobe de carbone de fluorure de vinylidene et d'hexafluoropropylene	Hautement élastique et résistant au stress mécanique, résistant à la dégradation
<i>Polymères résorbables</i>		
PDLLA	Polymère d'acide polylactique	Totalement biodégradable par dégradation uniforme en eau et CO ₂
PLGA	Polymère d'acide polyglycolique et d'acide polylactique.	Dégradation de l'acide polylactique par hydrolyse et par excrétion rénale.
PLEC	Polymère de lactone (polyester)	Faible dégradation par hydrolyse lente. Permet une dissolution du PC puis une diffusion.

Figure 69. Vue d'ensemble de polymères utilisés pour fonctionnaliser des dispositifs endovasculaires.

PC: phosphorylcholine. PBMA: poly-n-butyl methacrylate. PDLLA : acide poly(D,L) lactique. PEVA : polyethylene-co-vinyl acétate. PGA : acide polyglycolique. PLA : acide polylactique. PLEC: poly(L-lactide-co-ε-caprolactone). PLGA: poly (D, L-lactide-co-glycolide). PVDF-HFP: poly (vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene). SIBS: poly(styrene-block-isobutylene-block-styrene).

Stents sans polymères: Certains stents actifs ont été développés sans polymères, dont l'intérêt théorique est de garder les bénéfices des drogues à libération locale tout en évitant de contribuer à l'inflammation liée à la présence du « corps étranger » représenté par le stent lui-même, potentialisé par l'effet pro-inflammatoire du polymère. Le défi réside dans le développement d'une méthode de dépôt du principe actif sans recourir à l'utilisation de polymère. L'utilisation de modifications de surface, telles que la création de nanopores, conduit au dépôt effectif du principe actif. Néanmoins, cette technique entraîne une diminution de la cinétique de libération du principe actif. Un exemple est le stent Yukon (Translumina, Allemagne), composé d'acier inoxydable et libérant du paclitaxel dont l'éluion était quasi totale au bout d'une semaine. En considérant que l'effet cytotoxique des drogues ne soit pas sélectif (et que leur éluion à moyen terme soit tenue pour responsable du retard d'endothélialisation associé aux stents actifs classiques), il paraît logique que l'endothélialisation des stents Yukon soit accélérée comparée aux stents actifs classique dans l'étude randomisée de Moore et

al. (157). Toutefois, l'essai ISAR n'a pas permis de déterminer la supériorité des stents sans polymères dans la pathologie coronarienne. Toutefois, le stent Yukon est pour l'instant validé seulement en termes de non-infériorité (essai ISAR-TEST 5 (158)) et l'accélération de l'endothélialisation ne semble pas suffisante pour apporter un bénéfice clinique. Ces résultats pourraient s'expliquer par un phénotype altéré des cellules endothéliales, au contact du métal. Les principes actifs peuvent aussi être véhiculés via des nanoparticules, pouvant permettre une pénétration et une élution rapides au sein de la paroi artérielle. Les principes actifs sont alors chargés dans un réservoir sur la face abluminale du stent. La surface fonctionnalisée varie selon les dispositifs : carbone ultra-mince (stent Cre8 de CID Vascular, Italie), hydroxyapatite (VESTAsync) ou à même le métal (OPTIMA, CID, Italie) avec une variété de métaux utilisés. Enfin, au vu de l'absence de résultats concluants sur ce type de dispositifs, d'autres essais sont nécessaires afin de mettre en évidence l'utilité de ce type de fonctionnalisation dans le domaine des stents.

II. CONSIDERATIONS TECHNIQUES ET TRANSLATIONNEL DU PROJET

II.1. Choix de la technique : pourquoi le dip-coating ?

La surface des dispositifs médicaux endovasculaires est composée de métal ou de textile (Dacron, PTFE, polyuréthane). Ces surfaces ne présentent pas les caractéristiques chimiques permettant une conjugaison directe avec des biomolécules. Il faut donc dans un premier temps « fonctionnaliser » ces surfaces afin de permettre l'immobilisation covalente des peptides. Plusieurs techniques de fonctionnalisation existent et c'est le choix de la fonctionnalisation polymérique qui a été fait, son alternative (fonctionnalisation au plasma) étant ardue sur des surfaces métalliques. Le principe de la fonctionnalisation polymérique consiste en la formation de couches intermédiaires entre le matériau et le peptide. Cette technique a un faible coût et est relativement facile à réaliser. De nombreux polymères peuvent être utilisés, permettant une large gamme de choix et de s'adapter aux différentes tailles de peptides. Le cahier des charges d'une fonctionnalisation de dispositifs vasculaire doit répondre aux questions d'affinité, de résistance aux contraintes physiques et mécaniques lors du sertissage/déploiement et de stabilité dans le temps.

Dip coating : La technique de dip-coating est une procédure simple, impliquant l'immersion du stent dans une solution contenant le polymère de choix dissous dans une solution (aqueuse ou organique). Cette technique a un faible coût et est relativement facile à mettre en place. Le principal désavantage de cette technique est la formation d'un revêtement non uniforme. Cependant, cette technique est utilisée dans de nombreuses études expérimentales (159–161). Plusieurs études font état de l'utilisation d'acide polylactique (162) , de polydopamine (163), d'hexaméthylènediamine (164) ou de phosphorylcholine (165) l'ensemble permet l'obtention d'un film nanométrique à la surface de l'alliage et permet d'obtenir des résultats précliniques intéressants en termes de biocompatibilité. De nombreux paramètres influencent la formation et l'épaisseur de la couche du revêtement final : la concentration du polymère, les propriétés du solvant, la viscosité, le temps d'immersion, le nombre de cycles d'immersion et la vitesse d'immersion jouent un rôle-clé dans l'aspect et les caractéristiques finales du revêtement. La quantité de polymère obtenue par dip-coating semble moindre que celle appliquée avec d'autres méthodes comme l'électrofilage (« electrospinning ») (164).

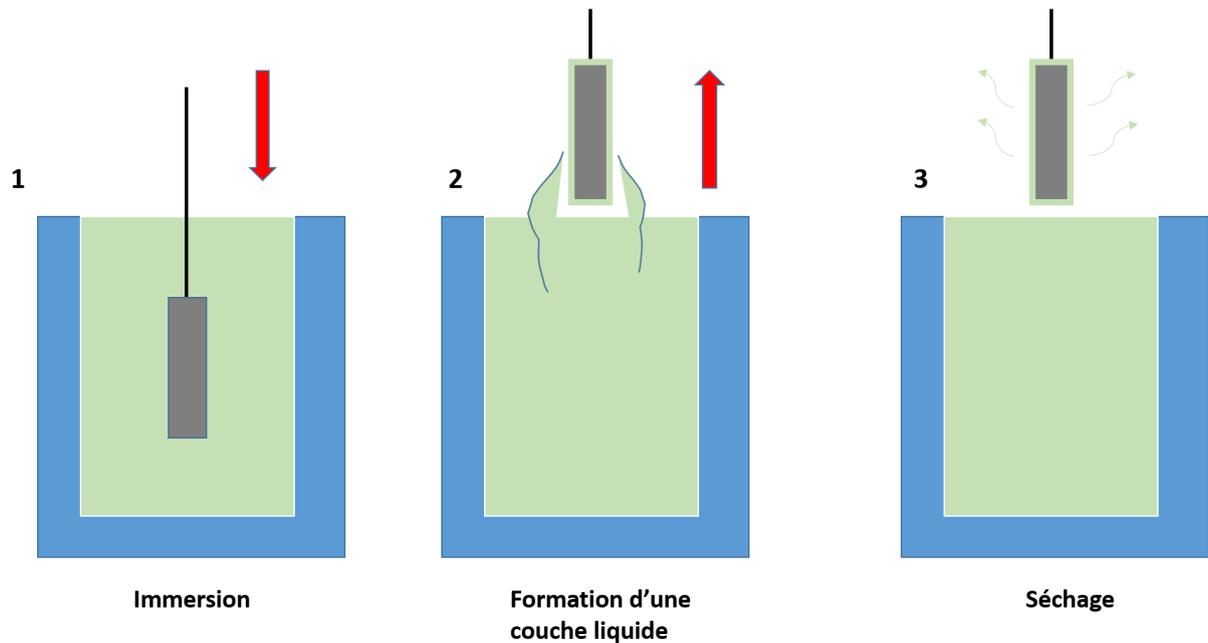


Figure 70. Principe du dip-coating d'une surface dans une solution contenant le solvant et le polymère.

Ces cycles peuvent varier en nombre et en vitesse d'immersion et de séchage.

Traitement au plasma : Le revêtement de polymères assisté par plasma (« plasma-enhanced chemical vapor deposition », PECVD) consiste à générer un plasma (contenant des monomères gazeux ou nébulisés) au-dessus de la surface à fonctionnaliser dans un réacteur (166–168). Le traitement au plasma consiste en l'application d'un champ électrique ou électromagnétique avec un gaz. Il en résulte l'ionisation du gaz et l'accélération des électrons le composant. Le plasma est caractérisé par un nombre élevé de collisions entre les électrons et les éléments lourds conduisant (outre l'ionisation) à la dissociation et l'excitation des éléments lourds. Cette technique permet un revêtement dense et adhérent à faible perméabilité et dont le processus peut être optimisé à des fins de développement industriel, ce qui en fait une technique de choix pour le revêtement de dispositifs médicaux.

Electrofilage : L'électrofilage permet de déposer des gouttelettes atomisées à haute charge sur les surfaces à traiter, conduisant à un revêtement à façon, homogène et versatile. Des techniques complémentaires de déposition par électrophorèse ont également été développées. Des travaux expérimentaux ont permis de mettre en évidence que les techniques d'électrofilage semblaient permettre une application de polymères satisfaisante et un relargage de principe actif plus pérenne en comparaison à l'application classique (164,169); en revanche, aucune évaluation clinique n'a encore été menée (164,169).

Le dip-coating représentait donc la méthode la plus rapide et rentable en termes de cout et d'efficacité pour tester l'application de la 1^{ère} couche de notre revêtement, constituée de polydopamine. Cette technique permet la formation d'une couche de l'ordre de 45 nm après application longue (entre 18 et 20 h). Toutefois, après caractérisation, cette couche était non uniforme car elle présentait de nombreux agrégats. Pour y remédier, nous avons standardisé notre méthode en appliquant de façon systématique (que ce soit pour les pastilles ou les dispositifs endovasculaires entiers) un bref bain à ultrasons permettant d'enlever ces agrégats tout en conservant une couche mince de polydopamine de l'ordre de 10 nm. Ce dernier point est d'importance puisqu'il permet la disparition des agrégats, dont les trimères (DHI)₂/PCA auraient un effet cytotoxique (170). Cette couche finale de 10 nm est stable jusqu'à 1 an en conditions statiques dans nos observations. Toutefois, nous n'avons pas testé cette permanence en conditions de flux physiologiques.

Cette technique est également versatile, permettant le revêtement rapide de différents métaux et d'autres matériaux comme cités dans ce manuscrit. Certains travaux ont montré la constitution d'un film de PDA sur le PTFE hydrophobe sur des prothèses diaphragmatiques à l'aide d'un simple dip-coating (171) mais cette méthode ne pouvait pas s'appliquer à des stents couverts dont la force hydrostatique de la lumière interne (en raison de petits diamètres) et l'hydrophobicité du polyuréthane empêchait la solution de dopamine de pénétrer dans la lumière. Ces contraintes ont pu être « vaincues » en utilisant une pompe à flux péristaltique bidirectionnelle (**Figure 48**). Ces résultats satisfaisants sur le plan macroscopique nécessitent cependant un travail de caractérisation plus poussé concernant le polyuréthane des stents couverts qui représente un axe de développement des projets à venir. Enfin, cette technique permet le revêtement simultané ou en série de dispositifs, représentant un gain de temps précieux.

Un des désavantages à l'application de polydopamine par dip-coating est la nécessité de strict contrôle du pH, de la température et du temps d'immersion (172). La création du film de PDA est lente au cours du temps, nécessitant souvent plus de 16h (173) , rendant impropre cette technique à des métaux sensibles à la corrosion comme le Zinc ou le Magnésium (174), qui sont utilisés dans la fabrication de stents résorbables.

II.2. Choix de la couche fonctionnelle : pourquoi la polydopamine ?

La polydopamine (PDA) est un polymère dérivé de la dopamine, une catécholamine de petite taille, capable de se polymériser en solution basique. Son utilisation en tant que revêtement de surface ne cesse de croître depuis sa première description en 2007 par Lee et Messersmith (134). Cette découverte, inspirée par les fibres permettant l'adhésion des moules à diverses surfaces, a ouvert la voie à son utilisation croissante dans la fonctionnalisation de différents types d'alliages. La clé initiale pour obtenir ce revêtement covalent a été la découverte de son auto-polymérisation en milieu aqueux alcalin, similaire au processus de formation de mélanine (134). Le mécanisme exact sous-jacent de cette auto-polymérisation fait encore débat dans le milieu scientifique. Il a été démontré que les processus impliquent l'oxydation de la dopamine en dopamine-quinone puis de sa cyclisation et oxydation, menant à une structure de conformation en 5,6-dihydroxyindole (DHI) (175), suivies par l'agrégation de monomères de polydopamine (176) par liaisons non covalentes ou covalentes (170). De nombreuses techniques permettent cette auto-polymérisation avec des vitesses variables en fonction des conditions utilisées : variant de 30 minutes en présence d'oxygène pur (rôle de catalyseur) à 24h (177) en utilisant un milieu alcalin ; La méthode lente, utilisant ce même milieu alcalin, permet de jouer sur l'épaisseur du film, variant de 4 nm à 70 nm (174, 178). Les premiers travaux de Lee et Messersmith ont montré qu'une telle polymérisation est applicable à une grande variété de surfaces dont les métaux et alliages utilisés dans les dispositifs médicaux tels que l'acier inoxydable, le nitinol, le PTFE ou encore les polyuréthanes. Cette versatilité est expliquée par la présence des groupements -catéchol et -amine, présentant des similitudes avec les acides aminés L-DOPA et L-lysine présents dans la protéine *mefp*, responsable de l'adhésion intense des moules en milieu aqueux (179).

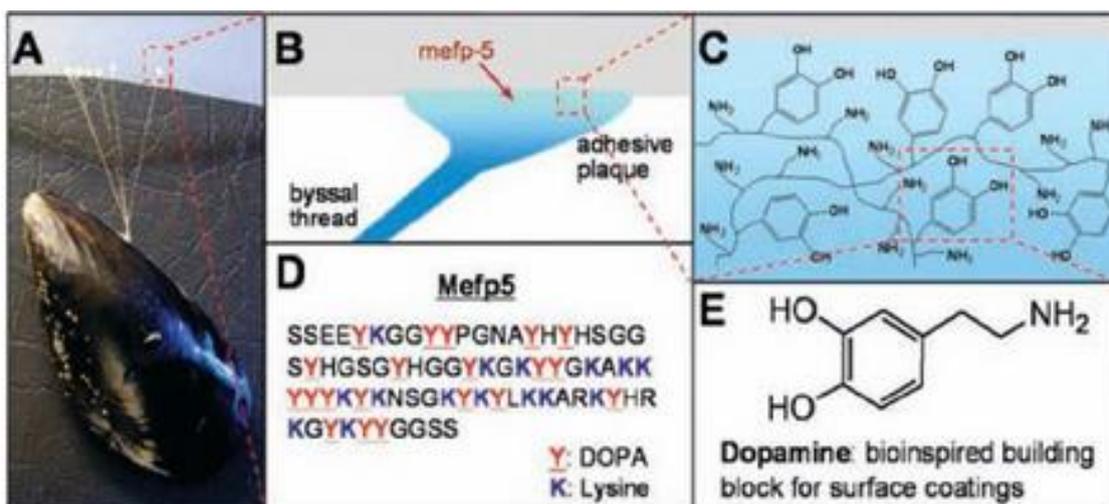


Figure 71. Polydopamine. A. Moule marine. B. Protéine *mefp-5* du mucus possédant des fonctions catéchols et amine (C), procurées par la L-DOPA et la L-lysine (D), dont la structure est proche de la dopamine (E). D'après Lee (134).

La PDA possède intrinsèquement de nombreuses qualités de biocompatibilité. Elle inhibe la production de radicaux libres par ses groupements -phénol (180), possède des propriétés *in vitro* et *in vivo* antiprolifératives vis-à-vis des cellules musculaires lisses et promeut la prolifération de cellules endothéliales (163). Par ailleurs, la PDA présente également une stabilité prolongée (181,182), caractéristique indispensable au développement d'un revêtement soumis au flux ininterrompu de cellules circulantes du sang. Au vu de ces éléments, la PDA possède plusieurs qualités intrinsèques qui pourrait en faire un revêtement de choix. Toutefois ce revêtement ne s'est pas développé en tant que tel (PDA seule). La PDA ne semble pas avoir de propriétés anti-thrombotiques, des études retrouvant une agrégation plaquettaire plus importante sur des stents en Titane fonctionnalisés à la PDA (183), avec une absorption de fibrinogène plus élevée (163,183) par rapport à des stents nus. Diaz-Rodriguez et al. retrouvait dans des études *in vitro* le relargage par les cellules endothéliales coronaires des facteurs solubles pro-thrombotiques comme le facteur tissulaire ou la P-selectine sur des disques de CoCr fonctionnalisés à la PDA seule (126). D'autres travaux *in vivo* ont porté sur le développement de stents en CoCr revêtus de PDA seule et leur implantation chez le rat (184) et retrouvaient une diminution de la resténose avec un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses vasculaires par rapports aux stents nus. En revanche, l'agrégation plaquettaire n'était pas spécifiquement explorée.

L'intérêt crucial de la PDA réside dans son utilisation en tant que couche intermédiaire, permettant un second revêtement sur mesure. En effet, en raison des groupement -thiol ou -amine obtenus après polymérisation, la surface de PDA obtenu représente une interface idéale pour des réactions secondaires. La polydopamine, véritable « scotch bi-face » (Janus-like), est donc extrêmement polyvalente et utilisées dans des domaines comme l'électrochimie (185), les batteries (186) et la santé (allant de l'orthopédie à la chirurgie vasculaire). La PDA peut donc permettre l'adjonction de métaux (187), de molécules bioactives comme des polysaccharides (188), des lipides (189), des membranes complexes (190) ou encore des agents anti-infectieux (191).

Concernant l'utilisation de la PDA dans le domaine des dispositifs endovasculaires, elle a été utilisée comme couche intermédiaire de fonctionnalisation de stents en CoCr pour greffer de l'héparine (192), de cyclodextrine (193) (aussi appelée « cage à principe actif », permettant une libération de drogues lipophiles, comparable à un nouveau stent actif), du VEGF (194) ou encore des anticorps anti-CD34 « captureurs » de cellules progénitrices de cellules endothéliales (195). L'étude de ce type de revêtement, tant sur le plan *in vitro* qu'*in vivo*, a démontré la faisabilité de ces fonctionnalisations menant à une augmentation de l'endothélialisation accompagnée d'une diminution de l'agrégation plaquettaire *in vitro*, et une réduction du taux de resténose chez l'animal.

II.3. Considérations autour des caractéristiques physico-chimiques de notre revêtement

Épaisseur du revêtement PDA-DBCO-CD31. Dans nos travaux, nous avons pu déterminer par microscopie à force atomique (**Figure 21**) une épaisseur de couche de PDA de l'ordre de 4 nm soit dix fois plus fine que celle initialement décrite par Lee et Messerschmidt (45 nm). Cette différence est due à notre utilisation systématique d'un bain à ultrasons après application de la couche de PDA (22h). Ce bain permet de faire disparaître les macro-agrégats de PDA, dont les trimères (DHI)₂/PCA auraient un effet cytotoxique (170). L'épaisseur additionnelle du DBCO et du peptide mimétique du CD31 sont respectivement de 2 nm et de 3 nm, conférant une épaisseur totale de revêtement de l'ordre d'environ 15 nm. Bien que nous n'ayons pas testé *in vivo* plusieurs épaisseurs de revêtement, il semble souhaitable d'obtenir un revêtement le plus fin possible pour limiter les effets adverses liés à sa dégradation *in vivo*.

Type de linker. L'intérêt d'utiliser une couche intermédiaire entre la PDA et les peptides mimétiques du CD31 est multiple. Le linker permet d'éviter des réactions entre les fonctions o-quinones des surfaces d'études et les fonctions amines latérales d'acides aminés du peptide plutôt que son N-terminal. Le second avantage est d'offrir la meilleure conformation stérique possible au peptide ainsi greffé. En effet, les groupements PEG permettent à la fois un éloignement satisfaisant des sites d'interaction des peptides par rapport à la couche de PDA et une biocompatibilité satisfaisante. Cette réflexion est partie de l'étude de la conformation tridimensionnelle des peptides mimétiques (**Figures 13-14**) mais une analyse tridimensionnelle du revêtement final PDA + DBCO + peptides CD31 pourrait apporter des données complémentaires intéressantes. Un autre intérêt d'utiliser le DBCO dans nos travaux est de permettre une certaine flexibilité au revêtement mais surtout de faire interagir sa fonction alcyne (triple liaison) avec la fonction azide (par modification de la fonction amine de la lysine en azide N₃) du peptide d'intérêt. Ces deux groupements sont indispensables pour la conjugaison du peptide d'intérêt par l'intermédiaire de la réaction par chimie-click (196).

Stabilité du complexe PDA + peptide. Nos données *in silico* semblent démontrer une certaine robustesse et homogénéité du revêtement. Toutefois, l'application à un dispositif endovasculaire impose de nombreuses contraintes mécaniques au revêtement liées au « crimping » et à la ré-expansion au sein du vaisseau cible. Des études pré-cliniques font état de la persistance du revêtement à la PDA sur des stents après expansion sans délamination (197). Nous avons également mené des essais préliminaires *in silico* de « crimping-decrimping » montrant la persistance du film de PDA avec des dénudations très limitées. Un test en utilisant un peptide fluorescent permettant de comparer l'intensité de fluorescence avant et après déploiement du dispositif fonctionnalisé permettrait de déterminer la persistance et l'étendue du revêtement. Des tests antérieurs de notre équipe retrouvaient la persistance du revêtement PDA-linker-peptide CD31 (P8RI couplé à un fluorophore) à 1

mois en solution aqueuse de PBS (Charlotte Rasser). Ces résultats sont en ligne avec d'autres équipes (197). Toutefois des tests en situation de flux pulsés pourraient permettre d'affirmer la pérennité de notre technique de fonctionnalisation en situation « physiologique ».

II.4. Un changement de paradigme du stenting artériel : de l'endothélialisation au phénotype de l'endothélium

D'un point de vue chronologique, l'évolution des dispositifs endovasculaires est passée d'une fonction « mécanique » des lésions (traitement d'une sténose, exclusion d'un anévrysme) à une approche de plus en plus « biologique », avec le développement des générations successives des stents actifs. La cible cellulaire de ces dispositifs, dont le marché mondial est estimé à 7.2 milliards d'US dollars, est la cellule musculaire lisse vasculaire dont l'inhibition de la prolifération retarde la sténose intra-stent mais n'empêche pas les thromboses tardives et très tardives (38), dans lesquelles on a vu l'importance capitale de la permanence de l'exposition du matériel métallique. Un pan parallèle de recherche s'est alors mis en place avec les stents biorésorbables d'une part (dont l'impact clinique est encore limité) et le développement de modification de surfaces permettant de cibler différents mécanismes de la biologie vasculaire de l'autre. C'est ce dernier point que l'on dénomme « médecine régénérative ».

Devant les complications liées à l'exposition du matériau étranger aux cellules du sang circulant, le défaut de croissance des cellules endothéliales de l'hôte à la surface des stents actifs a rapidement été identifié comme une « cible biologique » d'intérêt (145,198,199). Après la cellule musculaire lisse vasculaire, ciblée par les principes actifs des stents actifs, c'est autour de la cellule endothéliale que la recherche fondamentale s'est portée, avec pour but de promouvoir une néo-endothélialisation. Ce concept « régénératif » vise à promouvoir l'intégration du dispositif dans la paroi vasculaire par l'intermédiaire d'une couche mince faite uniquement de cellules endothéliales (sans hyperplasie néointimale) à la surface du dispositif médical. De multiples stratégies se sont alors profilées (129), avec la conception de revêtement dont la géométrie permettrait de favoriser l'endothélialisation (« micro-patterns » (200)), de revêtements capables de cibler le secrétome cellulaire (201), de capturer les cellules endothéliales progénitrices circulantes ou encore de libérer des produits/facteurs de croissance de la cellule endothéliale (comme le monoxyde d'azote ou le VEGF (202)) . Le concept de capture des cellules endothéliales est particulièrement intéressant, et utilise des anticorps reconnaissant les précurseurs de cellules endothéliales comme l'anti CD34 (203) , le VE-cad (204) ou encore le CD133 (205), intégrés en tant que revêtements applicables aux stents. Ainsi, les équipes de Lee et Wu ont démontré *in vitro* une endothélialisation plus rapide en utilisant des anti-CD133 (205) et anti-VE-cad (204) comparativement aux surfaces nues. Toutefois, des études chez le porc ont montré une

hyperplasie intra-stent malgré une endothélialisation précoce dans le cas des anti-CD34 (206) et une absence d'efficacité de l'utilisation des anti-CD133 (207). Ces résultats se sont confirmés chez l'Homme dans les stents à double revêtement sirolimus et CD34, avec des taux de néo-endothélialisation jusqu'à 76% nécessitant des réinterventions très fréquentes (40% des cas) (208). Ces résultats décevants peuvent s'expliquer en partie par la spécificité incomplète des anti-CD34 (207), l'hétérogénéité des cellules progénitrices de cellules endothéliales (209,210) ou encore leur rôle finalement secondaire dans la régénération endothéliale (211).

Malgré une endothélialisation rapide dans le cas des stents Yukon et des stents nus, les complications thrombotiques et le risque de resténose restent considérables et similaires entre les deux types de dispositifs. Le fait est que les cellules endothéliales représentent bien plus qu'une simple barrière : elles possèdent des fonctions majeures d'homéostasie vasculaire comprenant le tonus vasculaire, l'adhésion plaquettaire, l'activation leucocytaire, la relaxation et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (212). Cependant, soumises à des contraintes pathologiques, comme en présence d'un corps étranger, les cellules endothéliales vont s'activer et libérer du facteur tissulaire, activant une cascade de coagulation extrinsèque (FVII, IX et Xa) promouvant la génération de thrombine et favorisant l'agrégation plaquettaire (213). Pour illustrer ce point, notre équipe avait précédemment démontré que le taux de facteur tissulaire libéré par les cellules endothéliales cultivées *in vitro* sur les surfaces en CoCr était significativement plus élevé sur les surfaces nues comparées aux surfaces fonctionnalisées avec des peptides mimant le domaine 6 du CD31 (P8RI) (126). Il faudrait donc que l'innovation soit en mesure de reproduire un endothélium « physiologique » à la surface de stent, et non pas uniquement la formation d'une couche de cellules endothéliales.

II.5. Revêtement CD31 mimétique : pourquoi avoir ciblé précisément les domaines proximaux du CD31 ?

Nos travaux portant sur la fonctionnalisation des dispositifs endovasculaires avec un revêtement mimétique du CD31 ont été initiés par Charlotte Rasser avec l'utilisation d'un peptide issu de la région juxta-membranaire du CD31, le P8RI (126,127). L'objectif était d'exploiter les propriétés régulatrices de ce peptide pour réduire les réactions adverses de cellules endothéliales et du sang s'activant au site d'implantation, favorisant ainsi l'intégration des dispositifs *in vivo* (214). Toutefois, les avantages spécifiques de la fonctionnalisation au P8RI apparaissent limités lors de l'exposition des surfaces aux cellules endothéliales quiescentes (non activées) comparés aux surfaces adhésives non spécifiques comme la PDA, *in vitro*. Cet effet limité pourrait s'expliquer par le fait que la séquence cible du P8RI est « cachée » par l'encombrement stérique généré par la présence des 6 domaines extracellulaires du CD31 à la surface des cellules au repos, rendant l'interaction du P8RI avec sa séquence cible improbable. L'effet du revêtement P8RI réside dans le cas de scénarii où les cellules interagissant avec les dispositifs sont majoritairement activées, comme dans le cas d'artères atteintes d'athérosclérose (214). Toutefois, l'implantation de dispositifs endovasculaires impose des zones d'amarrage en zone saine de part et d'autre de la lésion comme dans le cas d'anévrismes sacculaires intracérébraux ou de stents périphériques. De plus, ces dispositifs endovasculaires sont continuellement exposés aux cellules circulantes du sang, non nécessairement activées, qui participent à la genèse de la sténose intra-stent. C'est dans cette optique d'intégration optimale des dispositifs par une endothélialisation rapide et pacifique, sans perturber l'homéostasie vasculaire, que nous avons raffiné nos peptides d'intérêt mimant les domaines 1 et/ou 2 du CD31.

II.6. Réaction endothéliale *in vitro* : phénotype et croissance

Le CD31 est la glycoprotéine membranaire la plus abondante dans les cellules endothéliales vasculaires (110) (> 1 M/cellule), motivant son utilisation. Le CD31 joue également un rôle dans la reconstitution de la barrière endothéliale après une lésion artérielle aigue (98), qui survient lors de l'implantation de tout dispositif endovasculaire. Dans nos travaux, non seulement les vitesses d'endothélialisation *in vitro* (Scratch-test) et *in vivo* (recouvrement précoce et pérenne de la surface luminale des dispositifs implantés) étaient augmentées à l'aide du peptide SP1072, mais l'utilisation de ce dernier était également associée à un phénotype des cellules endothéliales se rapprochant le plus de l'état physiologique par rapport aux différents groupes d'étude. En effet, l'augmentation significative de F-actine dans les groupes nus et PDA comparativement au groupe peptides mimant le CD31 lors des essais *in vitro* témoigne d'un stress cellulaire important (215) et souligne la pertinence d'une approche

ciblant la portion trans-homophile du CD31. En effet, le ratio CD31/F-actine était significativement plus élevé dans tous les groupes des peptides CD31 trans-homophiles. Cette notion est particulièrement clé car l'acquisition d'un phénotype cellulaire plus physiologique par les cellules endothéliales colonisant le dispositif signifie que le dispositif lui-même est perçu comme un endothélium normal. Des méthodes plus poussées de caractérisation phénotypique (cytométrie de flux) pourraient permettre de mettre en évidence plus clairement le phénotype des cellules cultivées sur disques de CoCr. Néanmoins, cette approche se heurte à des difficultés techniques comprenant notamment le faible nombre de cellules utilisées par puits. Une autre piste intéressante serait de caractériser les jonctions cellulaires en utilisant un marquage d'intégrines et de cadhérines en immunofluorescence (127). Le pourcentage de surface recouverte (% de confluence) et la vitesse d'endothélialisation étaient également significativement augmentées dans le groupe SP1072 par rapport au groupe sans fonctionnalisation dans l'expérimentation dite de scratch-test, résultats qui ont ensuite été confirmés *in vivo* chez le lapin. Cette vitesse d'endothélialisation est capitale sur le plan translationnel du fait du fort lien entre persistance de l'exposition du matériel métallique au sang circulant et formation de thrombus.

Endothélialisation *in vivo*, tissu artériel sain : De façon cohérente avec la littérature, l'implantation de stents non fonctionnalisés était associée de façon précoce à une agrégation plaquettaire, suivie d'une endothélialisation incomplète à partir de J + 7, qui se complétait entre J + 15 et J + 30 mais était associée à une hyperplasie néo-intimale marquée à J + 30. L'hyperplasie néo-intimale était également présente à J + 15 et J + 30 dans les stents PDA mais nous ne bénéficions pas d'assez de sujets pour affirmer la réduction de cette hyperplasie par rapport aux stents nus, soutenue par Hertault et al (184). Les résultats des stents fonctionnalisés avec le Sirolimus sont concordant avec la littérature décrivant une endothélialisation retardée (216) avec une hyperplasie néo-intimale modérée (217). Toutefois, il persistait à J + 30 des zones de stents non recouvertes par le néo-endothélium, potentiellement à risque de thrombose tardive.

Les propriétés homéostatiques du peptide SP1072 mimétique du CD31 se sont vérifiées *in vivo* avec des résultats similaires en fonction des dispositifs étudiés (flow diverters en nitinol et stents non couverts en CoCr). Malgré l'absence de comparaisons statistiques en raison d'un faible nombre de sujets dans chaque groupe, l'endothélialisation semblait être obtenue plus tôt, menant au recouvrement de l'intégralité du tissu péri-stent et les mailles du stent lui-même. Ce néo-endothélium était plus fin, pérenne dans le temps et ne semblait pas constituer d'hyperplasie néo-intimale aux temps les plus longs de nos observations. Cette endothélialisation associée au SP1072 n'était pas associée à la présence de micro-thrombus (agrégats plaquettaires) ou à une invasion leucocytaire marquée. Sur la base de ces expériences préliminaires, la fonctionnalisation de dispositifs endovasculaires fonctionnalisés avec un peptide mimétique du CD31 semble permettre la constitution

rapide d'une barrière endothéliale saine, recouvrant totalement les dispositifs, avec des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques.

Cette stratégie diffère sensiblement de celles actuellement utilisées dans les stents actifs et permet de s'affranchir des contraintes inhérentes au stent actif que sont la faible documentation de l'élution des principes actifs à long terme et la persistance de l'exposition des polymères et des surfaces métalliques au sang circulant, pouvant conduire à des complications cliniques sévères. Dans notre stratégie, n'est présenté aux cellules circulantes du sang qu'un endothélium sain avec comme ligne de mire la restauration de ses propriétés homéostatiques. Ces conclusions préliminaires encourageantes nécessitent toutefois des temps d'études prolongés (120 jours), une caractérisation phénotypique plus poussées du néo-endothélium et l'implantation de tels dispositifs fonctionnalisés en situation pathologique (athérosclérose).

Endothélialisation in vivo, tissu artériel pathologique : D'un point-de-vue translationnel, l'endothélialisation est un point déterminant de la cicatrisation des anévrismes cérébraux traités par flow-diverters (218). L'endothélialisation des flow-diverters au sein des anévrismes sacciformes semblait plus rapide et homogène dans le groupe SP1072 que dans le groupe nu. Toutefois, des données sont manquantes pour permettre de conclure à un effet significatif du peptide SP1072 dans nos travaux. Des résultats prometteurs issus des travaux menés au sein de notre unité par Jonathan Cortese et Charlotte Rasser ont permis de mettre en évidence une cicatrisation plus rapide d'anévrismes expérimentaux et la constitution d'un néo-endothélium à l'aide de flow-diverters fonctionnalisés avec le peptide P8RI dans le cadre d'essais *in vivo* chez le gros animal (127). Il est à noter que ce peptide mimétique du CD31 clivé était d'autant plus d'intérêt qu'il ciblait les cellules de l'interface sang/vaisseaux activées, dont la portion extracellulaire du CD31 (domaines 1 à 5) avait été clivé. Ainsi, c'est l'effet restaurateur du P8RI qui a été étudié dans leurs travaux. Des études complémentaires sur de plus larges effectifs et une comparaison au P8RI sont nécessaires pour évaluer le potentiel thérapeutique du peptide SP1072 en situation pathologique.

Adhérence plaquettaire : Les résultats obtenus avec l'utilisation de surfaces fonctionnalisées avec la PDA seule, *in vitro*, sont discordants par rapport aux résultats obtenus avec des stents recouverts de PDA *in vivo*. Il est possible que l'absence de contrainte dynamique dans nos manipulations sur sang total *in vitro* (qui avaient lieu sous agitation orbitale continue) ait pu induire un biais car les contraintes hémodynamiques imposées aux plaquettes *in vivo* sont bien plus complexes. Comme déjà observé dans nos travaux précédents (126), la PDA exerce un effet pro-agrégant *in vivo*, comme documenté par la présence de très nombreux micro-thrombis à la surface des dispositifs CoCr ainsi qu'à la surface des

flow diverters implantés dans des vaisseaux sains. Par le biais d'interactions trans-homophiles CD31-CD31, le seuil d'activation des plaquettes et des leucocytes est élevé dans le sang circulant (81,88). L'absence de micro-thrombus à la surface des dispositifs recouverts avec le peptide CD31 dans nos études *in vivo* (FD et stents CoCr) est une preuve encourageante du caractère non-thrombotique spécifique de notre revêtement, pourtant apposé sur une couche de PDA. Ainsi, l'avantage de rajouter le linker DBCO et le CD31 (en plus de l'interaction trans-homophile du CD31) permet de masquer les groupements libres -amine et -catéchol de la couche de PDA et donc de diminuer l'interaction non spécifique de la PDA avec les cellules de l'interface sang-vaisseau dont les plaquettes. Cependant, des temps d'études plus longs (120 jours) sont nécessaires pour étudier l'effet à long terme d'une telle fonctionnalisation en termes d'agrégation plaquettaire.

III. LIMITATIONS ET PERSPECTIVES

III.1. Limitations.

L'endothélialisation précoce des dispositifs fonctionnalisés avec des peptides mimétiques du CD31 observée dans nos résultats est encourageante et souligne la preuve de concept de l'augmentation de la biocompatibilité de notre stratégie. Cependant, de très nombreux défis limitent l'aspect translationnel de nos résultats. Les pistes de recherche complémentaires incluent une caractérisation plus poussée du revêtement sur le plan moléculaire afin de connaître la conformation adoptée par le peptide une fois greffé sur le dispositif, la pérennité du revêtement en flux et au cours du temps, la détermination du phénotype exact des cellules endothéliales et des jonctions intercellulaires au contact des différentes surfaces fonctionnalisées, des tests *in vitro* en conditions de flux et des études *in vivo* à des temps tardifs (> 120 jours). De plus, un échantillonnage plus grand *in vivo* et l'implantation de tels dispositifs fonctionnalisés dans des modèles pathologiques (athérosclérose, anévrismes) permettraient de confirmer nos premiers résultats encourageants. Ces travaux seront poursuivis au cours de projets de Master 2 dans l'unité.

III.2. Applications potentielles des dispositifs fonctionnalisés avec des peptides mimétiques du CD31

Flow-diverters et stents. Ces travaux expérimentaux ont permis la validation de la preuve de concept en termes de fonctionnalisation de plusieurs matériaux utilisés en pratique clinique grâce à la versatilité du revêtement à base de PDA. Dans le champ de la neuroradiologie interventionnelle, la modification de surface expérimentale par ajout de phosphorylcholine dans des dispositifs de type PED (Pipeline Flex Shield Technology, Medtronic) a démontré des résultats *in vitro* encourageants (diminution de la thrombogénicité, augmentation de l'endothélialisation (20,219,220)) mais s'est heurtée à des occlusions précoces et des complications hémorragiques lors d'essais cliniques (221). L'absence de micro-thrombus rapportée dans notre étude à la surface des dispositifs flow-diverters fonctionnalisés chez l'animal permettrait peut-être d'éviter ou de diminuer la durée d'administration de la double anti-agrégation plaquettaire traditionnellement prescrite dans ces indications (222), pourvoyeuse de complications hémorragiques graves (15). Cet avantage pourrait également se retrouver dans l'application au stenting coronaire et artériel périphérique. Les recommandations sur la durée d'anti-agrégation plaquettaire après stenting sont actuellement de 6 à 12 mois dans la pathologie athéromateuse coronaire (128) et de 1 mois dans l'AOMI (223), cette bithérapie étant également dans ces indications associée à des complications hémorragiques (224). Le recouvrement précoce et pérenne des surfaces métalliques thrombogènes des dispositifs endovasculaires associée à la présence

d'un néo-endothélium fin sans hyperplasie myo-intimale est l'objectif poursuivi par les approches dites de la « médecine régénérative » précédemment détaillées. Des études comparatives rigoureuses sont nécessaires pour permettre de déterminer le potentiel de tels dispositifs endovasculaires fonctionnalisés avec des peptides mimétiques du CD31 aux étages cérébraux, coronaires et périphériques.

Stents couverts. La poursuite de nos travaux sur les stents portera sur les dispositifs couverts, avec la perspective de diminuer la RIS de ces dispositifs (204), qui sont utilisés en première ligne à l'étage aorto-iliaque (225), dans le stenting des artères réno-viscérales (226,227) ou encore dans le traitement de sténoses veineuses sur accès d'hémodialyse (228). Des travaux préliminaires ont été initiés au cours de ma thèse avec la fonctionnalisation effective du polyuréthane et du PTFE. Nous avons réalisé des implantations dans l'aorte saine de rat Wistar de stents coronaires (Papyrus PK, Biotronik) fonctionnalisés avec le peptide SP1072 ou nus. Les résultats histologiques et biologiques de ces manipulations sont en cours d'interprétation. Ces travaux seront poursuivis par un Master 2 dans l'unité.

Endoprothèses aortiques. Un champ d'application non exploré dans nos travaux est celui des EP aortiques pour anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA). Trois études randomisées contrôlées ont montré le bénéfice à court terme du traitement endovasculaire (EVAR) par rapport au traitement conventionnel chirurgical ouvert (OR) en termes de morbi-mortalité à 30 jours : DREAM (229,230), EVAR 1-2 (231) et OVER (232). En revanche, les études EVAR (231) retrouvaient une mortalité plus importante liée à l'AAA après 8 ans, notamment par rupture, soulignant déjà un manque de résultat pérenne des EP. Bien que l'argument des courbes d'apprentissage et des premières générations d'EP puisse être retenu (ces études ayant débuté fin 1999), la récente méta-analyse de Antoniou et al. (233) regroupant sept études randomisées contrôlées comparant EVAR versus OR retrouve ces mêmes résultats, à savoir une moindre mortalité à 30 jours dans le groupe EVAR mais une propension plus importante aux réinterventions, à la rupture et de décès par rupture d'AAA dans le groupe EVAR. De façon curieuse, peu de mécanismes physiopathologiques ont été proposés pour expliquer de tels résultats. Plusieurs hypothèses peuvent toutefois être avancées, comme la progression de la pathologie anévrysmale après EVAR, le défaut d'intégration des EP, la fatigabilité du matériel pourraient à des degrés divers concourir à la persistance de la pressurisation du sac anévrysmal, et donc au risque dramatique de rupture. Sur le plan histologique, de la même façon que pour les stents coronaires ou périphériques, des études animales retrouvaient une incorporation de l'EP dans le mur aortique avec une néointima composée de cellules musculaires lisses et de collagène associée à une réaction inflammatoire persistante autour de l'EP et des phénomènes cicatriciels fibrotiques au niveau des collets proximaux et distaux (234). Cette incorporation incomplète des EP, retrouvée par Malina et al. jusqu'à 3 ans après implantation (235), pourrait participer aux résultats décevants du traitement

endovasculaire des AAA. Un autre argument de l'absence de l'incorporation pacifique des EP est la présence du syndrome post-implantatoire (SPI) rapporté dans 15 à 60% des cas (236,237), dont l'impact sur la morbi-mortalité postopératoire et les événements cardio-vasculaires à long terme sont actuellement débattus (238,239). Du point de vue biologique, le marqueur plasmatique le plus relevant dans le SPI est l'interleukine-6 (IL-6) car constamment augmenté après EVAR dans les études (240), contrairement à d'autres marqueurs (MMP-9, TNF- α). L'IL-6 joue un rôle immunomodulateur systémique et promeut des cascades pro-inflammatoires via la voie JAK-STAT3 (241). La source de production d'IL-6 dans le SPI se trouve au niveau des cellules endothéliales aortiques (242–244). L'IL-6 plasmatique est significativement augmentée après implantation d'EP aortiques (238,245) ou après chirurgie ouverte (246), confortant le concept de lésion vasculaire iatrogène directe. Une autre source de relargage d'IL-6 est le thrombus intraluminal. Ce dernier est riche en IL-6 (247) et sa manipulation au cours de la procédure endovasculaire pourrait concourir à un relargage supplémentaire d'IL-6 systémique. Les composants de l'EP pourraient jouer un rôle sur le niveau de relargage d'IL-6, le PTFE causant moins de relargage d'IL-6 que le Dacron in vitro (248,249). L'implantation de stents coronaires fonctionnalisés dans l'aorte anévrysmale du rat Wistar et leur analyse seront conduites par un Master 2 dans l'unité.

Valves cardiaques. Les valves cardiaques biologiques sont associées à un moindre risque hémorragique initial par rapport aux valves prothétiques (250) mais présentent un risque de dégénérescence à long terme (251), exposant le patient à une réintervention à haut risque chirurgical (252). Cette dégénérescence de valve biologique (DVB) est un processus irréversible se manifestant par la croissance d'un pannus, une fibrose et calcification des feuillets, la délamination du tissu conjonctif évoluant vers la perforation et/ou la rupture (253). Le pannus est composé de cellules endothéliales, de myofibroblastes et de plusieurs types de cellules de l'immunité telles que les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles et les cellules géantes à corps étranger (254). Les mécanismes de DVB sont imparfaitement élucidés et comprennent notamment une réaction immunitaire tardive et un remodelage inflammatoire athérosclérotique. En effet, du fait du traitement chimique des valves (glutaraldéhyde dans le cas des xénovalves) menant à la destruction des cellules interstitielles valvulaires, la durabilité des valves biologiques ne dépend plus que de la solidité de la matrice extra-cellulaire et de sa résistance aux différentes agressions hémodynamiques au long cours. Des complications évolutives peuvent apparaître, notamment l'apparition de calcifications. Ces dernières peuvent être liées à la prothèse et/ou au patient lui-même (255). Par ailleurs, la dégradation de la matrice extra-cellulaire permet la pénétration de globules rouges à même d'induire une dégradation par oxydation (dépôts de fer) du tissu biologique prothétique. Il n'existe à ce jour aucun traitement validé pour la prévention ou le traitement de la DVB. Certains auteurs ont suggéré l'administration de statines (256) ou d'immunosuppresseurs (257) dans la prévention de la DVB, sans succès. Bien que les

mécanismes à l'œuvre soient complexes et impliquent le design des valves, le processus de décellularisation, l'immunité et le stress mécanique, la constitution d'une barrière endothéliale saine aux propriétés anti-thrombotiques et anti-inflammatoire via leur fonctionnalisation de surface peut être une piste intéressante.

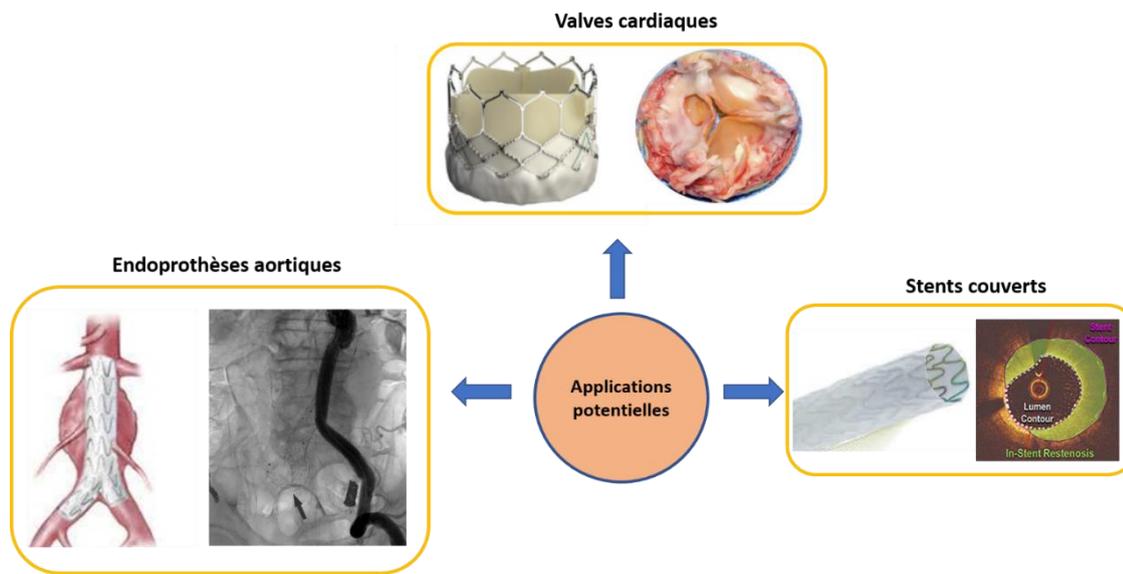


Figure 72. Applications potentielles de la fonctionnalisation de surface à l'aide de peptides mimétiques du CD31

CONCLUSIONS

Nous avons comme objectifs de fonctionnaliser la surface de différents dispositifs endovasculaires constitué de différents alliages (nitinol ou CoCr) et ayant différentes conformations (flow diverter auto-expansible ou stent sur ballon) à l'aide avec de peptides mimétiques des domaines 1/2 du CD31. Après avoir validé et caractérisé le développement de la modification de surface, nous avons pu évaluer leur biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* en termes d'effets sur l'endothélialisation et l'agrégation plaquettaire.

Nous avons réussi à fonctionnaliser ces dispositifs en utilisant notre méthode brevetée à base de polydopamine, menant au greffage permanent d'un panel de peptides analogues du CD31. Cette méthode de fonctionnalisation « bio-inspirée » s'est révélée fiable, reproductible, versatile (applicable à différents matériaux) et permet la fonctionnalisation à large échelle d'un grand nombre d'échantillons. Nos résultats préliminaires ont montré des effets favorables à l'endothélialisation et anti-thrombotiques de cette fonctionnalisation, en imitant les domaines distaux du CD31 impliqués dans les interactions entre cellules. À partir de nos résultats expérimentaux, il semble que ce revêtement favorise la formation rapide d'une barrière endothéliale *in vivo*, que ce soit dans un vaisseau sain ou pathologique (anévrisme sacciforme).

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses stratégies ont vu le jour, que ce soit au niveau académique ou industriel, afin d'augmenter la biocompatibilité des dispositifs endovasculaires utilisés en clinique, ces derniers présentant des complications maintenant bien identifiées. Une grande partie de ces recherches a porté sur l'amélioration des stents non-couverts, laissant ainsi les problématiques des stents couverts en suspens, peut-être en raison de leur développement plus récent et de leur utilisation moindre comparativement aux stents non couverts. L'utilisation de peptides mimétiques des domaines distaux du CD31 représente une piste prometteuse, potentiellement applicable à différents systèmes qu'il s'agisse de dispositifs vasculaires, neurologiques ou cardiaques, et nécessite des études approfondies pour déterminer son potentiel.

Cette approche pourrait se révéler particulièrement intéressante dans le cas des stents couverts et d'endoprothèses aortiques, ces dispositifs présentant des complications spécifiques dont la résolution est incomplète (258). La poursuite de nos travaux portera notamment sur ces sujets.

Valorisation

Ces travaux ont été récompensés du 1^{er} prix lors de la session « Translational Research Meeting / Young Research Prize » au congrès Européen des Biomatériaux Vasculaires (ESVB, Strasbourg, Avril 2023) et ainsi que du 1^{er} prix du congrès annuel de la Société de Chirurgie Vasculaire Européenne (ESVS, Belfast, Septembre 2023).

Deux Research Letters indiquant le potentiel translationnel de nos travaux ont été publiées dans une revue d'intérêt pour les chirurgiens vasculaires (European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, Q1) et un article original se référant au mécanisme d'action de nos peptides a été soumis à une revue plus fondamentale, le journal « Biomimetics » (Q2).

Enfin, l'utilisation de ces peptides appliquées aux dispositifs endovasculaires a été protégée par le dépôt de 2 brevets, dont un en copropriété entre nos tutelles académiques et un industriel du secteur (Alchimedics).

Bibliographie

1. Raymond J, Guilbert F, Weill A, Georganos SA, Juravsky L, Lambert A, et al. Long-term angiographic recurrences after selective endovascular treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke*. juin 2003;34(6):1398-403.
2. Ferns SP, Sprengers MES, van Rooij WJ, van Zwam WH, de Kort GAP, Velthuis BK, et al. Late reopening of adequately coiled intracranial aneurysms: frequency and risk factors in 400 patients with 440 aneurysms. *Stroke*. mai 2011;42(5):1331-7.
3. Wakhloo AK, Schellhammer F, de Vries J, Haberstroh J, Schumacher M. Self-expanding and balloon-expandable stents in the treatment of carotid aneurysms: an experimental study in a canine model. *AJNR Am J Neuroradiol*. mars 1994;15(3):493-502.
4. Lanzino G, Wakhloo AK, Fessler RD, Hartney ML, Guterman LR, Hopkins LN. Efficacy and current limitations of intravascular stents for intracranial internal carotid, vertebral, and basilar artery aneurysms. *J Neurosurg*. oct 1999;91(4):538-46.
5. Lopes D, Sani S. Histological postmortem study of an internal carotid artery aneurysm treated with the Neuroform stent. *Neurosurgery*. févr 2005;56(2):E416; discussion E416.
6. Lieber BB, Stancampiano AP, Wakhloo AK. Alteration of hemodynamics in aneurysm models by stenting: influence of stent porosity. *Ann Biomed Eng*. 1997;25(3):460-9.
7. Augsburg L, Farhat M, Raymond P, Fonck E, Kulcsar Z, Stergiopoulos N, et al. Effect of flow diverter porosity on intraaneurysmal blood flow. *Klin Neuroradiol*. août 2009;19(3):204-14.
8. Sadasivan C, Cesar L, Seong J, Rakian A, Hao Q, Tio FO, et al. An original flow diversion device for the treatment of intracranial aneurysms: evaluation in the rabbit elastase-induced model. *Stroke*. mars 2009;40(3):952-8.
9. Kallmes DF, Ding YH, Dai D, Kadirvel R, Lewis DA, Cloft HJ. A new endoluminal, flow-disrupting device for treatment of saccular aneurysms. *Stroke*. août 2007;38(8):2346-52.
10. Arrese I, Sarabia R, Pintado R, Delgado-Rodriguez M. Flow-diverter devices for intracranial aneurysms: systematic review and meta-analysis. *Neurosurgery*. Août 2013;73(2):193-9; discussion 199-200.
11. Briganti F, Leone G, Marseglia M, Mariniello G, Caranci F, Brunetti A, et al. Endovascular treatment of cerebral aneurysms using flow-diverter devices: A systematic review. *Neuroradiol J*. août 2015;28(4):365-75.
12. Raymond J, Guilbert F, Metcalfe A, Gévry G, Salazkin I, Robledo O. Role of the endothelial lining in recurrences after coil embolization: prevention of recanalization by endothelial denudation. *Stroke*. juin 2004;35(6):1471-5.
13. Bonney PA, Connor M, Fujii T, Singh P, Koch MJ, Stapleton CJ, et al. Failure of Flow Diverter Therapy: Predictors and Management Strategies. *Neurosurgery*. 1 janv 2020;86(Suppl 1):S64-73.
14. Kulcsár Z, Houdart E, Bonafé A, Parker G, Millar J, Goddard AJP, et al. Intra-aneurysmal thrombosis as a possible cause of delayed aneurysm rupture after flow-diversion treatment. *AJNR Am J Neuroradiol*. janv 2011;32(1):20-5.

15. Pandit A, Giri S, Hakim FA, Fortuin FD. Shorter (≤ 6 months) versus longer (≥ 12 months) duration dual antiplatelet therapy after drug eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 1 janv 2015;85(1):34-40.
16. Kealey CP, Whelan SA, Chun YJ, Soojung CH, Tulloch AW, Mohanchandra KP, et al. In vitro hemocompatibility of thin film nitinol in stenotic flow conditions. *Biomaterials.* déc 2010;31(34):8864-71.
17. Nishi H, Ishii A, Ono I, Abekura Y, Ikeda H, Arai D, et al. Biodegradable Flow Diverter for the Treatment of Intracranial Aneurysms: A Pilot Study Using a Rabbit Aneurysm Model. *J Am Heart Assoc.* 15 oct 2019;8(20):e014074.
18. Lenz-Habijan T, Bhogal P, Peters M, Bufe A, Martinez Moreno R, Bannewitz C, et al. Hydrophilic Stent Coating Inhibits Platelet Adhesion on Stent Surfaces: Initial Results In Vitro. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 1 nov 2018;41(11):1779-85.
19. Liu P, Liu Y, Li P, Zhou Y, Song Y, Shi Y, et al. Rosuvastatin- and Heparin-Loaded Poly(l-lactide-co-caprolactone) Nanofiber Aneurysm Stent Promotes Endothelialization via Vascular Endothelial Growth Factor Type A Modulation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 5 déc 2018;10(48):41012-8.
20. Matsuda Y, Jang DK, Chung J, Wainwright JM, Lopes D. Preliminary outcomes of single antiplatelet therapy for surface-modified flow diverters in an animal model: analysis of neointimal development and thrombus formation using OCT. *J Neurointerventional Surg.* janv 2019;11(1):74-9.
21. Li Z, Zhao R, Fang X, Zhou J, Jiang G, Huang Q, et al. AMD3100 Accelerates Reendothelialization of Neointima in Rabbit Saccular Aneurysm After Flow Diverter Treatment. *World Neurosurg.* 1 nov 2017;107:416-23.
22. Panchendrabose K, Muram S, Mitha AP. Promoting endothelialization of flow-diverting stents: a review. *J Neurointerventional Surg.* janv 2021;13(1):86-90.
23. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med.* 19 mars 1987;316(12):701-6.
24. Palmaz JC, Richter GM, Nöldge G, Kauffmann GW, Wenz W. [Intraluminal Palmaz stent implantation. The first clinical case report on a balloon-expanded vascular prosthesis]. *Radiol.* déc 1987;27(12):560-3.
25. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials.* mars 2007;28(9):1689-710.
26. Watson T, Webster MWI, Ormiston JA, Ruygrok PN, Stewart JT. Long and short of optimal stent design. *Open Heart.* 2017;4(2):e000680.
27. Balcon R, Beyar R, Chierchia S, De Scheerder I, Hugenholtz PG, Kiemeneij F, et al. Recommendations on stent manufacture, implantation and utilization. Study Group of the Working Group on Coronary Circulation. *Eur Heart J.* oct 1997;18(10):1536-47.
28. Butany J, Carmichael K, Leong SW, Collins MJ. Coronary artery stents: identification and evaluation. *J Clin Pathol.* août 2005;58(8):795-804.
29. Noad RL, Hanratty CG, Walsh SJ. Clinical Impact of Stent Design. *Interv Cardiol Lond Engl.* avr 2014;9(2):89-93.

30. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STERO) trial. *Circulation*. 12 juin 2001;103(23):2816-21.
31. Dotter CT, Buschmann RW, McKinney MK, Rösch J. Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: preliminary report. *Radiology*. avr 1983;147(1):259-60.
32. A comparison of balloon- and self-expanding stents. *Minim Invasive Ther Allied Technol MITAT Off J Soc Minim Invasive Ther*. juill 2002;11(4):173-8.
33. Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 15 avr 1997;95(8):1998-2002.
34. Ho KJ, Owens CD. Diagnosis, classification, and treatment of femoropopliteal artery in-stent restenosis. *J Vasc Surg*. févr 2017;65(2):545-57.
35. Singh GD, Armstrong EJ, Laird JR. Femoropopliteal in-stent restenosis: current treatment strategies. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. juin 2014;55(3):325-33.
36. Schillinger M, Minar E. Past, present and future of femoropopliteal stenting. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec*. févr 2009;16 Suppl 1:147-152.
37. Vu MH, Sande-Docor GM, Liu Y, Tsai S, Patel M, Metzger C, et al. Endovascular Treatment and Outcomes for Femoropopliteal In-Stent Restenosis: Insights from the XLPAD Registry. *J Intervent Cardiol*. 2022;2022:5935039.
38. Giustino G, Colombo A, Camaj A, Yasumura K, Mehran R, Stone GW, et al. Coronary In-Stent Restenosis: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 26 juill 2022;80(4):348-72.
39. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*. 5 janv 1999;99(1):44-52.
40. Edelman ER, Rogers C. Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol*. 9 avr 1998;81(7A):4E-6E.
41. Chung IM, Gold HK, Schwartz SM, Ikari Y, Reidy MA, Wight TN. Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *J Am Coll Cardiol*. 18 déc 2002;40(12):2072-81.
42. Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 1 nov 1992;20(5):1284-93.
43. Otsuka F, Byrne RA, Yahagi K, Mori H, Ladich E, Fowler DR, et al. Neointimal hyperplasia: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur Heart J*. 21 août 2015;36(32):2147-59.
44. Karas SP, Gravanis MB, Santoian EC, Robinson KA, Anderberg KA, King SB. Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *J Am Coll Cardiol*. août 1992;20(2):467-74.
45. Nakano M, Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Kutys R, Ladich ER, et al. Human autopsy study of drug-eluting stents restenosis: histomorphological predictors and neointimal characteristics. *Eur Heart J*. nov 2013;34(42):3304-13.

46. Chieffo A, Foglieni C, Nodari RL, Briguori C, Sangiorgi G, Latib A, et al. Histopathology of clinical coronary restenosis in drug-eluting versus bare metal stents. *Am J Cardiol.* 15 déc 2009;104(12):1660-7.
47. Carnicer-Lombarte A, Chen ST, Malliaras GG, Barone DG. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:622524.
48. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *J Am Coll Cardiol.* 31 août 2010;56(10 Suppl):S43-78.
49. Sousa JE, Serruys PW, Costa MA. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I. *Circulation.* 6 mai 2003;107(17):2274-9.
50. Ruygrok PN, Serruys PW. Intracoronary stenting. From concept to custom. *Circulation.* 1 sept 1996;94(5):882-90.
51. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation.* 8 mai 2007;115(18):2435-41.
52. Rizas KD, Mehilli J. Stent Polymers: Do They Make a Difference? *Circ Cardiovasc Interv.* juin 2016;9(6):e002943.
53. Yin J, Li Y, Chen Y, Wang C, Song X. Biodegradable polymer everolimus-eluting stents versus contemporary drug-eluting stents: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 31 janv 2023;13(1):1715.
54. Bønaa KH, Mannsverk J, Wiseth R, Aaberge L, Myreng Y, Nygård O, et al. Drug-Eluting or Bare-Metal Stents for Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 29 sept 2016;375(13):1242-52.
55. Sen H, Tandjung K, Basalus MWZ, Löwik MM, van Houwelingen GK, Stoel MG, et al. Comparison of eligible non-enrolled patients and the randomised TWENTE trial population treated with Resolute and Xience V drug-eluting stents. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* oct 2012;8(6):664-71.
56. Palmerini T, Biondi-Zoccai G, Della Riva D, Stettler C, Sangiorgi D, D'Ascenzo F, et al. Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 14 avr 2012;379(9824):1393-402.
57. Bavry AA, Kumbhani DJ, Helton TJ, Borek PP, Mood GR, Bhatt DL. Late thrombosis of drug-eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Med.* déc 2006;119(12):1056-61.
58. Condello F, Spaccarotella C, Sorrentino S, Indolfi C, Stefanini GG, Polimeni A. Stent Thrombosis and Restenosis with Contemporary Drug-Eluting Stents: Predictors and Current Evidence. *J Clin Med.* 3 févr 2023;12(3):1238.
59. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 4 juill 2006;48(1):193-202.
60. Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, et al. Durable Clinical Effectiveness With Paclitaxel-Eluting Stents in the Femoropopliteal Artery: 5-Year Results of the Zilver PTX Randomized Trial. *Circulation.* 12 avr 2016;133(15):1472-83; discussion 1483.

61. Gouëffic Y, Torsello G, Zeller T, Esposito G, Vermassen F, Hausegger KA, et al. Efficacy of a Drug-Eluting Stent Versus Bare Metal Stents for Symptomatic Femoropopliteal Peripheral Artery Disease: Primary Results of the EMINENT Randomized Trial. *Circulation*. 22 nov 2022;146(21):1564-76.
62. Katsanos K, Spiliopoulos S, Kitrou P, Krokidis M, Karnabatidis D. Risk of Death Following Application of Paclitaxel-Coated Balloons and Stents in the Femoropopliteal Artery of the Leg: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*. 18 déc 2018;7(24):e011245.
63. Mathlouthi A, Yei KS, Naazie I, Bertges DJ, Malas MB. Increased mortality with paclitaxel-eluting stents is driven by lesion length. *J Vasc Surg*. févr 2021;73(2):548-553.e2.
64. Kereiakes DJ, Onuma Y, Serruys PW, Stone GW. Bioresorbable Vascular Scaffolds for Coronary Revascularization. *Circulation*. 12 juill 2016;134(2):168-82.
65. Hou LD, Li Z, Pan Y, Sabir M, Zheng YF, Li L. A review on biodegradable materials for cardiovascular stent application. *Front Mater Sci*. 1 sept 2016;10(3):238-59.
66. Kitabata H, Waksman R, Warnack B. Bioresorbable metal scaffold for cardiovascular application: current knowledge and future perspectives. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv*. mars 2014;15(2):109-16.
67. Elsner M, Auch-Schwelk W, Britten M, Walter DH, Schächinger V, Zeiher AM. Coronary stent grafts covered by a polytetrafluoroethylene membrane. *Am J Cardiol*. 1 août 1999;84(3):335-8.
68. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. juill 2005;74(1):570-81.
69. Chalmers RT, Hoballah JJ, Sharp WJ, Kresowik TF, Corson JD. Effect of an endovascular stent on healing of an end-to-end polytetrafluoroethylene-artery anastomosis in a canine model. *Br J Surg*. oct 1994;81(10):1443-7.
70. von Birgelen C, Haude M, Herrmann J, Altmann C, Klinkhart W, Welge D, et al. Early clinical experience with the implantation of a novel synthetic coronary stent graft. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. août 1999;47(4):496-503.
71. Homsy CA. Bio-compatibility in selection of materials for implantation. *J Biomed Mater Res*. sept 1970;4(3):341-56.
72. Di Mario C, Inglese L, Colombo A. Treatment of a coronary aneurysm with a new polytetrafluoroethylene-coated stent: a case report. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. avr 1999;46(4):463-5.
73. Chalmers RT, Hoballah JJ, Sharp WJ, Kresowik TF, Corson JD. The effect of an intraluminal stent on neointimal hyperplasia at an end-to-side polytetrafluoroethylene graft arterial anastomosis. *Am J Surg*. août 1994;168(2):85-90.
74. Stankovic G, Colombo A, Presbitero P, van den Branden F, Inglese L, Cernigliaro C, et al. Randomized evaluation of polytetrafluoroethylene-covered stent in saphenous vein grafts: the Randomized Evaluation of polytetrafluoroethylene COVERed stent in Saphenous vein grafts (RECOVERS) Trial. *Circulation*. 8 juill 2003;108(1):37-42.
75. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerck W, et al. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 1990;145(11):3889-97.

76. Newman PJ. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci.* 18 avr 1994;714:165-74.
77. Ohto H, Maeda H, Shibata Y, Chen RF, Ozaki Y, Higashihara M, et al. A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood.* oct 1985;66(4):873-81.
78. Newman PJ. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest.* janv 1999;103(1):5-9.
79. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 juin 2003;23(6):953-64.
80. Wu XW, Lian ECY. Binding Properties and Inhibition of Platelet Aggregation by a Monoclonal Antibody to CD31 (PECAM-1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* nov 1997;17(11):3154-8.
81. Jones KL, Hughan SC, Dopheide SM, Farndale RW, Jackson SP, Jackson DE. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. *Blood.* 1 sept 2001;98(5):1456-63.
82. Jones CI, Garner SF, Moraes LA, Kaiser WJ, Rankin A, Bloodomics Consortium, et al. PECAM-1 expression and activity negatively regulate multiple platelet signaling pathways. *FEBS Lett.* 19 nov 2009;583(22):3618-24.
83. Patil S, Newman DK, Newman PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood.* 15 mars 2001;97(6):1727-32.
84. Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, et al. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood.* 15 janv 2006;107(2):535-41.
85. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction - PubMed [Internet]. [cité 2 oct 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395658/>
86. Prager E, Staffler G, Majdic O, Säemann M, Godár S, Zlabinger G, et al. Induction of hyporesponsiveness and impaired T lymphocyte activation by the CD31 receptor:ligand pathway in T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 févr 2001;166(4):2364-71.
87. Henshall TL, Jones KL, Wilkinson R, Jackson DE. Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2001;166(5):3098-106.
88. Wilkinson R, Lyons AB, Roberts D, Wong MX, Bartley PA, Jackson DE. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. *Blood.* 1 juill 2002;100(1):184-93.
89. Wu Y, Stabach P, Michaud M, Madri JA. Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 sept 2005;175(6):3484-91.
90. Bayat B, Werth S, Sachs UJH, Newman DK, Newman PJ, Santoso S. Neutrophil transmigration mediated by the neutrophil-specific antigen CD177 is influenced by the endothelial S536N

- dimorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 avr 2010;184(7):3889-96.
91. Rui Y, Liu X, Li N, Jiang Y, Chen G, Cao X, et al. PECAM-1 ligation negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 2007;179(11):7344-51.
 92. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*. 11 juill 2002;418(6894):200-3.
 93. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 9 mars 1990;247(4947):1219-22.
 94. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. avr 1990;110(4):1227-37.
 95. Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem*. 10 mai 1996;271(19):11090-8.
 96. Newton JP, Buckley CD, Jones EY, Simmons DL. Residues on both faces of the first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31. *J Biol Chem*. 15 août 1997;272(33):20555-63.
 97. Ferrero E, Ferrero ME, Pardi R, Zocchi MR. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett*. 6 nov 1995;374(3):323-6.
 98. Biswas P, Canosa S, Schoenfeld D, Schoenfeld J, Li P, Cheas LC, et al. PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation. *Am J Pathol*. juill 2006;169(1):314-24.
 99. Gao C, Sun W, Christofidou-Solomidou M, Sawada M, Newman DK, Bergom C, et al. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood*. 1 juill 2003;102(1):169-79.
 100. Evans PC, Taylor ER, Kilshaw PJ. Signaling through CD31 protects endothelial cells from apoptosis. *Transplantation*. 15 févr 2001;71(3):457-60.
 101. Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, et al. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood*. 15 avr 2005;105(8):3169-77.
 102. Wu J, Sheibani N. Modulation of VE-cadherin and PECAM-1 mediated cell-cell adhesions by mitogen-activated protein kinases. *J Cell Biochem*. 1 sept 2003;90(1):121-37.
 103. Kondo S, Scheef EA, Sheibani N, Sorenson CM. PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. juin 2007;292(6):C2070-2083.
 104. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1 août 1993;178(2):449-60.

105. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*. 3 déc 1993;262(5139):1580-2.
106. Unkeless JC, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol*. juin 1997;9(3):338-43.
107. Paddock C, Zhou D, Lertkiatmongkol P, Newman PJ, Zhu J. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding. *Blood*. 25 févr 2016;127(8):1052-61.
108. Jackson DE, Ward CM, Wang R, Newman PJ. The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling. *J Biol Chem*. 14 mars 1997;272(11):6986-93.
109. Osawa M, Masuda M, Harada N, Lopes RB, Fujiwara K. Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Cell Biol*. mars 1997;72(3):229-37.
110. Varon D, Jackson DE, Shenkman B, Dardik R, Tamarin I, Savion N, et al. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. *Blood*. 15 janv 1998;91(2):500-7.
111. Cao MY, Huber M, Beauchemin N, Famiglietti J, Albelda SM, Veillette A. Regulation of mouse PECAM-1 tyrosine phosphorylation by the Src and Csk families of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 19 juin 1998;273(25):15765-72.
112. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 6 oct 2000;290(5489):84-9.
113. Ilan N, Mohsenin A, Cheung L, Madri JA. PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. févr 2001;15(2):362-72.
114. Wong MX, Harbour SN, Wee JL, Lau LM, Andrews RK, Jackson DE. Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif. *FEBS Lett*. 18 juin 2004;568(1-3):70-8.
115. Eugenin EA, Gamss R, Buckner C, Buono D, Klein RS, Schoenbaum EE, et al. Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *J Leukoc Biol*. mars 2006;79(3):444-52.
116. Fornasa G, Clement M, Groyer E, Gaston AT, Khallou-Laschet J, Morvan M, et al. A CD31-derived peptide prevents angiotensin II-induced atherosclerosis progression and aneurysm formation. *Cardiovasc Res*. 1 avr 2012;94(1):30-7.
117. Angelini G, Flego D, Vinci R, Pedicino D, Trotta F, Ruggio A, et al. Matrix metalloproteinase-9 might affect adaptive immunity in non-ST segment elevation acute coronary syndromes by increasing CD31 cleavage on CD4+ T-cells. *Eur Heart J*. 1 avr 2018;39(13):1089-97.
118. Fornasa G, Groyer E, Clement M, Dimitrov J, Compain C, Gaston AT, et al. TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 mai 2010;184(10):5485-92.
119. Clement M, Fornasa G, Loyau S, Morvan M, Andreatta F, Guedj K, et al. Upholding the T cell immune-regulatory function of CD31 inhibits the formation of T/B immunological synapses in vitro

- and attenuates the development of experimental autoimmune arthritis in vivo. *J Autoimmun.* janv 2015;56:23-33.
120. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2006;26(3):618-23.
 121. Andreato F, Syvannarath V, Clement M, Delbosc S, Guedj K, Fornasa G, et al. Macrophage CD31 Signaling in Dissecting Aortic Aneurysm. *J Am Coll Cardiol.* 3 juill 2018;72(1):45-57.
 122. Zehnder JL, Shatsky M, Leung LL, Butcher EC, McGregor JL, Levitt LJ. Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide. *Blood.* 1 mars 1995;85(5):1282-8.
 123. Tugyi R, Uray K, Iván D, Fellingner E, Perkins A, Hudecz F. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 janv 2005;102(2):413-8.
 124. Vigne J, Bay S, Aid-Launais R, Pariscoat G, Rucher G, Sénémaud J, et al. Cleaved CD31 as a target for in vivo molecular imaging of inflammation. *Sci Rep.* 20 déc 2019;9(1):19560.
 125. Sénémaud JN, Skarbek C, Vigne J, Rouzet F, Castier Y, Caligiuri G. Molecular Imaging of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms Targeting Vascular Homeostasis Disruption via CD31 Shedding. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* déc 2022;64(6):735-6.
 126. Diaz-Rodriguez S, Rasser C, Mesnier J, Chevallier P, Gallet R, Choqueux C, et al. Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *Eur Heart J.* 7 mai 2021;42(18):1760-9.
 127. Cortese J, Rasser C, Even G, Bardet SM, Choqueux C, Mesnier J, et al. CD31 Mimetic Coating Enhances Flow Diverting Stent Integration into the Arterial Wall Promoting Aneurysm Healing. *Stroke.* janv 2021;52(2):677-86.
 128. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 14 janv 2018;39(3):213-60.
 129. Selvakumar PP, Rafuse MS, Johnson R, Tan W. Applying Principles of Regenerative Medicine to Vascular Stent Development. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:826807.
 130. van Hinsbergh VWM. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):93-106.
 131. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* mai 2016;23(3):253-9.
 132. Hu M, Zhang H, Liu Q, Hao Q. Structural Basis for Human PECAM-1-Mediated Trans-homophilic Cell Adhesion. *Sci Rep.* 13 déc 2016;6(1):38655.
 133. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1 juin 2001;40(11):2004-21.

134. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*. 19 oct 2007;318(5849):426-30.
135. Stricker J, Falzone T, Gardel ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech*. 5 janv 2010;43(1):9-14.
136. Goldberger A, Middleton KA, Oliver JA, Paddock C, Yan HC, DeLisser HM, et al. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J Biol Chem*. 24 juin 1994;269(25):17183-91.
137. Hassler O, Fodstad H. Fibrinolytic activity in the walls of cerebral saccular aneurysms. *Acta Neurochir (Wien)*. 1977;37(1-2):49-55.
138. Palmaz JC, Bailey S, Marton D, Sprague E. Influence of stent design and material composition on procedure outcome. *J Vasc Surg*. nov 2002;36(5):1031-9.
139. Kastrati A, Schömig A, Dirschinger J, Mehilli J, von Welser N, Pache J, et al. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 30 mai 2000;101(21):2478-83.
140. Monnink SH, van Boven AJ, Peels HO, Tigchelaar I, de Kam PJ, Crijns HJ, et al. Silicon-carbide coated coronary stents have low platelet and leukocyte adhesion during platelet activation. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. juill 1999;47(6):304-10.
141. Haude M, Konorza TFM, Kalnins U, Erglis A, Saunamäki K, Glogar HD, et al. Heparin-coated stent placement for the treatment of stenoses in small coronary arteries of symptomatic patients. *Circulation*. 11 mars 2003;107(9):1265-70.
142. New G, Moses JW, Roubin GS, Leon MB, Colombo A, Iyer SS, et al. Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. oct 2002;57(2):266-71.
143. McCormick C. 1 - Overview of cardiovascular stent designs. In: Wall JG, Podbielska H, Wawrzyńska M, éditeurs. *Functionalised Cardiovascular Stents* [Internet]. Woodhead Publishing; 2018 [cité 10 oct 2023]. p. 3-26. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081004968000019>
144. Turco MA, Ormiston JA, Popma JJ, Mandinov L, O'Shaughnessy CD, Mann T, et al. Polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS Liberté stent in de novo lesions: the pivotal TAXUS ATLAS trial. *J Am Coll Cardiol*. 24 avr 2007;49(16):1676-83.
145. Scafa Udriște A, Niculescu AG, Grumezescu AM, Bădilă E. Cardiovascular Stents: A Review of Past, Current, and Emerging Devices. *Mater Basel Switz*. 12 mai 2021;14(10):2498.
146. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*. 17 févr 2004;109(6):701-5.
147. Curcio A, Torella D, Cuda G, Coppola C, Faniello MC, Achille F, et al. Effect of stent coating alone on in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. mars 2004;286(3):H902-908.

148. Otsuka F, Vorpahl M, Nakano M, Foerst J, Newell JB, Sakakura K, et al. Pathology of second-generation everolimus-eluting stents versus first-generation sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in humans. *Circulation*. 14 janv 2014;129(2):211-23.
149. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, van Beusekom HM, Serruys PW, Holmes DR, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1 oct 1996;94(7):1690-7.
150. Busch R, Strohbach A, Peterson S, Sternberg K, Felix S. Parameters of Endothelial Function are Dependent on Polymeric Surface Material. *Biomed Tech (Berl)*. août 2013;58 Suppl 1:/j/bmte.2013.58.issue-s1-C/bmt-2013-4053/bmt-2013-4053.xml.
151. Busch R, Strohbach A, Rethfeldt S, Walz S, Busch M, Petersen S, et al. New stent surface materials: the impact of polymer-dependent interactions of human endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets. *Acta Biomater*. févr 2014;10(2):688-700.
152. Jensen LO, Thayssen P, Maeng M, Ravkilde J, Krusell LR, Raungaard B, et al. Randomized Comparison of a Biodegradable Polymer Ultrathin Strut Sirolimus-Eluting Stent With a Biodegradable Polymer Biolimus-Eluting Stent in Patients Treated With Percutaneous Coronary Intervention: The SORT OUT VII Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. juill 2016;9(7):e003610.
153. Stefanini GG, Byrne RA, Serruys PW, de Waha A, Meier B, Massberg S, et al. Biodegradable polymer drug-eluting stents reduce the risk of stent thrombosis at 4 years in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a pooled analysis of individual patient data from the ISAR-TEST 3, ISAR-TEST 4, and LEADERS randomized trials. *Eur Heart J*. mai 2012;33(10):1214-22.
154. Serruys PW, Farooq V, Kalesan B, de Vries T, Buszman P, Linke A, et al. Improved safety and reduction in stent thrombosis associated with biodegradable polymer-based biolimus-eluting stents versus durable polymer-based sirolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease: final 5-year report of the LEADERS (Limus Eluted From A Durable Versus ERodable Stent Coating) randomized, noninferiority trial. *JACC Cardiovasc Interv*. août 2013;6(8):777-89.
155. Jakobsen L, Christiansen EH, Maeng M, Kristensen SD, Bøtker HE, Terkelsen CJ, et al. Randomized clinical comparison of the dual-therapy CD34 antibody-covered sirolimus-eluting Combo stent with the sirolimus-eluting Orsiro stent in patients treated with percutaneous coronary intervention: Rationale and study design of the Scandinavian Organization for Randomized Trials with Clinical Outcome (SORT OUT) X trial. *Am Heart J*. août 2018;202:49-53.
156. Tada N, Virmani R, Grant G, Bartlett L, Black A, Clavijo C, et al. Polymer-free biolimus a9-coated stent demonstrates more sustained intimal inhibition, improved healing, and reduced inflammation compared with a polymer-coated sirolimus-eluting cypher stent in a porcine model. *Circ Cardiovasc Interv*. avr 2010;3(2):174-83.
157. Moore P, Barlis P, Spiro J, Ghimire G, Roughton M, Di Mario C, et al. A randomized optical coherence tomography study of coronary stent strut coverage and luminal protrusion with rapamycin-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv*. mai 2009;2(5):437-44.
158. Massberg S, Byrne RA, Kastrati A, Schulz S, Pache J, Hausleiter J, et al. Polymer-free sirolimus- and probucol-eluting versus new generation zotarolimus-eluting stents in coronary artery disease: the Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Test Efficacy of Sirolimus- and Probucol-Eluting versus Zotarolimus-eluting Stents (ISAR-TEST 5) trial. *Circulation*. 2 août 2011;124(5):624-32.
159. Park S, Bhang SH, La WG, Seo J, Kim BS, Char K. Dual roles of hyaluronic acids in multilayer films capturing nanocarriers for drug-eluting coatings. *Biomaterials*. juill 2012;33(21):5468-77.

160. Bakhshi R, Edirisinghe MJ, Darbyshire A, Ahmad Z, Seifalian AM. Electrohydrodynamic jetting behaviour of polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposite. *J Biomater Appl.* janv 2009;23(4):293-309.
161. Levy Y, Mandler D, Weinberger J, Domb AJ. Evaluation of drug-eluting stents' coating durability-
-clinical and regulatory implications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* oct 2009;91(1):441-51.
162. Abdal-hay A, Barakat NAM, Lim JK. Influence of electrospinning and dip-coating techniques on the degradation and cytocompatibility of Mg-based alloy. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 5 mars 2013;420:37-45.
163. Yang Y, Qi P, Wen F, Li X, Xia Q, Maitz MF, et al. Mussel-inspired one-step adherent coating rich in amine groups for covalent immobilization of heparin: hemocompatibility, growth behaviors of vascular cells, and tissue response. *ACS Appl Mater Interfaces.* 27 août 2014;6(16):14608-20.
164. Liu Y, Wang W, Acharya G, Shim YB, Choe ES, Lee CH. Advanced stent coating for drug delivery and in vivo biocompatibility. *J Nanoparticle Res.* 15 sept 2013;15(10):1962.
165. Chen H, Zhao Y, Xiong K, Li J, Chen J, Yang P, et al. Multifunctional coating based on EPC-specific peptide and phospholipid polymers for potential applications in cardiovascular implants fate. *J Mater Chem B.* 28 déc 2016;4(48):7870-81.
166. Yang Z, Lei X, Wang J, Luo R, He T, Sun H, et al. A Novel Technique Toward Bipolar Films Containing Alternating Nano-Layers of Allylamine and Acrylic Acid Plasma Polymers for Biomedical Application. *Plasma Process Polym.* 2011;8(3):208-14.
167. Coad BR, Scholz T, Vasilev K, Hayball JD, Short RD, Griesser HJ. Functionality of proteins bound to plasma polymer surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* mai 2012;4(5):2455-63.
168. Qi P, Yang Y, Xiong K, Wang J, Tu Q, Yang Z, et al. Multifunctional Plasma-Polymerized Film: Toward Better Anticorrosion Property, Enhanced Cellular Growth Ability, and Attenuated Inflammatory and Histological Responses. *ACS Biomater Sci Eng.* 13 juill 2015;1(7):513-24.
169. Nukala RK, Boyapally H, Slipper IJ, Mendham AP, Douroumis D. The application of electrostatic dry powder deposition technology to coat drug-eluting stents. *Pharm Res.* janv 2010;27(1):72-81.
170. Hong S, Na YS, Choi S, Song IT, Kim WY, Lee H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv Funct Mater.* 2012;22(22):4711-7.
171. Talon I, Schneider A, Ball V, Hemmerle J. Polydopamine Functionalization: A Smart and Efficient Way to Improve Host Responses to e-PTFE Implants. *Front Chem.* 2019;7:482.
172. Mata D, Scharnagl N, Lamaka SV, Malheiro E, Maia F, Zheludkevich ML. Validating the early corrosion sensing functionality in poly (ether imide) coatings for enhanced protection of magnesium alloy AZ31. *Corros Sci.* 1 août 2018;140:307-20.
173. Zhang C, Ou Y, Lei WX, Wan LS, Ji J, Xu ZK. CuSO₄/H₂O₂-Induced Rapid Deposition of Polydopamine Coatings with High Uniformity and Enhanced Stability. *Angew Chem Int Ed.* 2016;55(9):3054-7.
174. Wei Q, Zhang F, Li J, Li B, Zhao C. Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings. *Polym Chem.* 12 oct 2010;1(9):1430-3.

175. Łuczak T. Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution. *Electrochimica Acta*. 1 août 2008;53(19):5725-31.
176. Dreyer DR, Miller DJ, Freeman BD, Paul DR, Bielawski CW. Elucidating the Structure of Poly(dopamine). *Langmuir*. 17 avr 2012;28(15):6428-35.
177. Kim HW, McCloskey BD, Choi TH, Lee C, Kim MJ, Freeman BD, et al. Oxygen Concentration Control of Dopamine-Induced High Uniformity Surface Coating Chemistry. *ACS Appl Mater Interfaces*. 23 janv 2013;5(2):233-8.
178. Qin Z, Li D, Ou Y, Du S, Jiao Q, Peng J, et al. Recent Advances in Polydopamine for Surface Modification and Enhancement of Energetic Materials: A Mini-Review. *Crystals*. juin 2023;13(6):976.
179. Tiu BDB, Delparastan P, Ney MR, Gerst M, Messersmith PB. Cooperativity of Catechols and Amines in High-Performance Dry/Wet Adhesives. *Angew Chem Int Ed*. 2020;59(38):16616-24.
180. Wu F, Li J, Zhang K, He Z, Yang P, Zou D, et al. Multifunctional Coating Based on Hyaluronic Acid and Dopamine Conjugate for Potential Application on Surface Modification of Cardiovascular Implanted Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 janv 2016;8(1):109-21.
181. Wu X, Yang C, Ge J, Liu Z. Polydopamine tethered enzyme/metal-organic framework composites with high stability and reusability. *Nanoscale*. 7 déc 2015;7(45):18883-6.
182. Saidin S, Chevallier P, Abdul Kadir MR, Hermawan H, Mantovani D. Polydopamine as an intermediate layer for silver and hydroxyapatite immobilisation on metallic biomaterials surface. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1 déc 2013;33(8):4715-24.
183. Ding Y, Yang Z, Bi CWC, Yang M, Zhang J, Xu SL, et al. Modulation of protein adsorption, vascular cell selectivity and platelet adhesion by mussel-inspired surface functionalization. *J Mater Chem B*. 28 mai 2014;2(24):3819-29.
184. Hertault A, Chai F, Maton M, Sobocinski J, Woisel P, Maurel B, et al. In vivo evaluation of a pro-healing polydopamine coated stent through an in-stent restenosis rat model. *Biomater Sci*. 5 janv 2021;9(1):212-20.
185. Cui X, Xu S, Jin C, Ji Y. Recent advances in the preparation and application of mussel-inspired polydopamine-coated capillary tubes in microextraction and miniaturized chromatography systems. *Anal Chim Acta*. 29 nov 2018;1033:35-48.
186. Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chem Rev*. 14 mai 2014;114(9):5057-115.
187. Ou J, Wang J, Zhang D, Zhang P, Liu S, Yan P, et al. Fabrication and biocompatibility investigation of TiO₂ films on the polymer substrates obtained via a novel and versatile route. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 mars 2010;76(1):123-7.
188. Facile fabrication and nanoscale assembly of polydopamine-functionalized, flexible chitosan films - Anne K Brooks, Muhammad Imran, Sayantan Pradhan, Jacob M Broitman, Vamsi K Yadavalli, 2021 [Internet]. [cité 3 oct 2023]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/08839115211046414>
189. Nirasay S, Badia A, Leclair G, Claverie JP, Marcotte I. Polydopamine-Supported Lipid Bilayers. *Materials*. 4 déc 2012;5(12):2621-36.

190. Marchesi D'Alvise T, Harvey S, Hueske L, Szelwicka J, Veith L, Knowles TPJ, et al. Ultrathin Polydopamine Films with Phospholipid Nanodiscs Containing a Glycophorin A Domain. *Adv Funct Mater.* 2020;30(21):2000378.
191. Xu Z, Wang T, Liu J. Recent Development of Polydopamine Anti-Bacterial Nanomaterials. *Int J Mol Sci.* 30 juin 2022;23(13):7278.
192. Bae IH, Park IK, Park DS, Lee H, Jeong MH. Thromboresistant and endothelialization effects of dopamine-mediated heparin coating on a stent material surface. *J Mater Sci Mater Med.* mai 2012;23(5):1259-69.
193. Sobocinski J, Laure W, Taha M, Courcot E, Chai F, Simon N, et al. Mussel inspired coating of a biocompatible cyclodextrin based polymer onto CoCr vascular stents. *ACS Appl Mater Interfaces.* 12 mars 2014;6(5):3575-86.
194. Lee SJ, Kim ME, Nah H, Seok JM, Jeong MH, Park K, et al. Vascular endothelial growth factor immobilized on mussel-inspired three-dimensional bilayered scaffold for artificial vascular graft application: In vitro and in vivo evaluations. *J Colloid Interface Sci.* 1 mars 2019;537:333-44.
195. Chen J, Li Q, Xu J, Zhang L, Maitz MF, Li J. Thromboresistant and rapid-endothelialization effects of dopamine and staphylococcal protein A mediated anti-CD34 coating on 316L stainless steel for cardiovascular devices. *J Mater Chem B.* 7 avr 2015;3(13):2615-23.
196. Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev.* avr 2010;39(4):1272-9.
197. Yang Z, Tu Q, Zhu Y, Luo R, Li X, Xie Y, et al. Mussel-inspired coating of polydopamine directs endothelial and smooth muscle cell fate for re-endothelialization of vascular devices. *Adv Healthc Mater.* sept 2012;1(5):548-59.
198. Cornelissen A, Vogt FJ. The effects of stenting on coronary endothelium from a molecular biological view: Time for improvement? *J Cell Mol Med.* janv 2019;23(1):39-46.
199. Bedair TM, ElNaggar MA, Joung YK, Han DK. Recent advances to accelerate re-endothelialization for vascular stents. *J Tissue Eng.* 2017;8:2041731417731546.
200. Cherian AM, Joseph J, Nair MB, Nair SV, Maniyal V, Menon D. Successful Reduction of Neointimal Hyperplasia on Stainless Steel Coronary Stents by Titania Nanotexturing. *ACS Omega.* 21 juill 2020;5(28):17582-91.
201. Hu S, Li Z, Shen D, Zhu D, Huang K, Su T, et al. Exosome-eluting stents for vascular healing after ischaemic injury. *Nat Biomed Eng.* oct 2021;5(10):1174-88.
202. Takabatake S, Hayashi K, Nakanishi C, Hao H, Sakata K, Kawashiri MA, et al. Vascular endothelial growth factor-bound stents: application of in situ capture technology of circulating endothelial progenitor cells in porcine coronary model. *J Intervent Cardiol.* févr 2014;27(1):63-72.
203. Jaguszewski M, Aloysius R, Wang W, Bezerra HG, Hill J, De Winter RJ, et al. The REMEDEE-OCT Study: An Evaluation of the Bioengineered COMBO Dual-Therapy CD34 Antibody-Covered Sirolimus-Eluting Coronary Stent Compared With a Cobalt-Chromium Everolimus-Eluting Stent in Patients With Acute Coronary Syndromes: Insights From Optical Coherence Tomography Imaging Analysis. *JACC Cardiovasc Interv.* 13 mars 2017;10(5):489-99.
204. Lim WH, Seo WW, Choe W, Kang CK, Park J, Cho HJ, et al. Stent coated with antibody against vascular endothelial-cadherin captures endothelial progenitor cells, accelerates re-

- endothelialization, and reduces neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2011;31(12):2798-805.
205. Li J, Li D, Gong F, Jiang S, Yu H, An Y. Anti-CD133 Antibody Immobilized on the Surface of Stents Enhances Endothelialization. *BioMed Res Int.* 2014;2014:902782.
206. van BHMM, Serruys PW. Drug-Eluting Stent Endothelium. *JACC Cardiovasc Interv.* janv 2010;3(1):76-7.
207. Sedaghat A, Sinning JM, Paul K, Kirfel G, Nickenig G, Werner N. First in vitro and in vivo results of an anti-human CD133-antibody coated coronary stent in the porcine model. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* juin 2013;102(6):413-25.
208. Blessing R, Ahoopai M, Geyer M, Brandt M, Zeiher AM, Münzel T, et al. The Bioengineered Combo Dual-Therapy CD34 Antibody-Covered Sirolimus-Eluting Coronary Stent in Patients with Chronic Total Occlusion Evaluated by Clinical Outcome and Optical Coherence Tomography Imaging Analysis. *J Clin Med.* 28 déc 2020;10(1):80.
209. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med.* mai 2017;6(5):1316-20.
210. Keighron C, Lyons CJ, Creane M, O'Brien T, Liew A. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med.* 2018;5:354.
211. Evans CE, Iruela-Arispe ML, Zhao YY. Mechanisms of Endothelial Regeneration and Vascular Repair and Their Application to Regenerative Medicine. *Am J Pathol.* janv 2021;191(1):52-65.
212. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 7 sept 2019;20(18):4411.
213. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 19 oct 2015;15(1):130.
214. Caligiuri G. CD31 as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. *Circ Res.* 24 avr 2020;126(9):1178-89.
215. Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* janv 2009;77(1):53-63.
216. Nakano M, Virmani R. Histopathology of vascular response to drug-eluting stents: an insight from human autopsy into daily practice. *Cardiovasc Interv Ther.* 1 janv 2015;30(1):1-11.
217. de Prado AP, Pérez-Martínez C, Cuellas-Ramón C, Gonzalo-Orden JM, Regueiro-Purriños M, Martínez B, et al. Time course of reendothelialization of stents in a normal coronary swine model: characterization and quantification. *Vet Pathol.* nov 2011;48(6):1109-17.
218. Ravindran K, Casabella AM, Cebra J, Brinjikji W, Kallmes DF, Kadirvel R. Mechanism of Action and Biology of Flow Diverters in the Treatment of Intracranial Aneurysms. *Neurosurgery.* 1 janv 2020;86(Suppl 1):S13-9.
219. Hagen MW, Girdhar G, Wainwright J, Hinds MT. Thrombogenicity of flow diverters in an ex vivo shunt model: effect of phosphorylcholine surface modification. *J Neurointerventional Surg.* oct 2017;9(10):1006-11.

220. Caroff J, Tamura T, King RM, Lylyk PN, Langan ET, Brooks OW, et al. Phosphorylcholine surface modified flow diverter associated with reduced intimal hyperplasia. *J Neurointerventional Surg.* nov 2018;10(11):1097-101.
221. Manning NW, Cheung A, Phillips TJ, Wenderoth JD. Pipeline shield with single antiplatelet therapy in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: multicentre experience. *J Neurointerventional Surg.* juill 2019;11(7):694-8.
222. Caroff J, Aubert L, Lavenu-Bombled C, Figueiredo S, Habchi K, Cortese J, et al. Antithrombotic therapies for neurointerventional surgery: a 2021 French comprehensive national survey. *J Neurointerventional Surg.* avr 2023;15(4):402-7.
223. Halliday A, Bax JJ. The 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in Collaboration With the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1 mars 2018;55(3):301-2.
224. Berry NC, Kereiakes DJ, Yeh RW, Steg PG, Cutlip DE, Jacobs AK, et al. Benefit and Risk of Prolonged DAPT After Coronary Stenting in Women. *Circ Cardiovasc Interv.* août 2018;11(8):e005308.
225. Mwipatayi BP, Sharma S, Daneshmand A, Thomas SD, Vijayan V, Altaf N, et al. Durability of the balloon-expandable covered versus bare-metal stents in the Covered versus Balloon Expandable Stent Trial (COBEST) for the treatment of aortoiliac occlusive disease. *J Vasc Surg.* 1 juill 2016;64(1):83-94.e1.
226. Mancuso E, Bootun R, Stather PW, Crawford M, Delbridge M, Tariq Ali M, et al. Predicting Features of Visceral Stent Failure in Fenestrated Endovascular Aortic Aneurysm Repair. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec.* 18 mai 2023;15266028231173309.
227. Venturini M, Marra P, Colombo M, Alparone M, Agostini G, Bertoglio L, et al. Endovascular Treatment of Visceral Artery Aneurysms and Pseudoaneurysms in 100 Patients: Covered Stenting vs Transcatheter Embolization. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec.* oct 2017;24(5):709-17.
228. Anaya-Ayala JE, Smolock CJ, Colvard BD, Naoum JJ, Bismuth J, Lumsden AB, et al. Efficacy of covered stent placement for central venous occlusive disease in hemodialysis patients. *J Vasc Surg.* sept 2011;54(3):754-9.
229. Blankensteijn JD, de Jong SECA, Prinssen M, van der Ham AC, Buth J, van Sterkenburg SMM, et al. Two-year outcomes after conventional or endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med.* 9 juin 2005;352(23):2398-405.
230. Prinssen M, Verhoeven ELG, Buth J, Cuypers PWM, van Sambeek MRHM, Balm R, et al. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med.* 14 oct 2004;351(16):1607-18.
231. Patel R, Sweeting MJ, Powell JT, Greenhalgh RM, EVAR trial investigators. Endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysm in 15-years' follow-up of the UK endovascular aneurysm repair trial 1 (EVAR trial 1): a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 12 nov 2016;388(10058):2366-74.
232. Lederle FA, Freischlag JA, Kyriakides TC, Padberg FT, Matsumura JS, Kohler TR, et al. Outcomes following endovascular vs open repair of abdominal aortic aneurysm: a randomized trial. *JAMA.* 14 oct 2009;302(14):1535-42.

233. Antoniou GA, Antoniou SA, Torella F. Editor's Choice - Endovascular vs. Open Repair for Abdominal Aortic Aneurysm: Systematic Review and Meta-analysis of Updated Peri-operative and Long Term Data of Randomised Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* mars 2020;59(3):385-97.
234. White JG, Mulligan NJ, Gorin DR, D'Agostino R, Yucel EK, Menzoian JO. Response of normal aorta to endovascular grafting: a serial histopathological study. *Arch Surg Chic Ill* 1960. mars 1998;133(3):246-9.
235. Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jönsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-grafts in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* janv 2000;19(1):5-11.
236. Sweeney KJ, Evoy D, Sultan S, Coates C, Moore DJ, Shanik DG, et al. Endovascular approach to abdominal aortic aneurysms limits the postoperative systemic immune response. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* avr 2002;23(4):303-8.
237. De La Motte L, Vogt K, Panduro Jensen L, Groenvall J, Kehlet H, Veith Schroeder T, et al. Incidence of systemic inflammatory response syndrome after endovascular aortic repair. *J Cardiovasc Surg (Torino).* févr 2011;52(1):73-9.
238. Arnaoutoglou E, Kouvelos G, Papa N, Kallinteri A, Milionis H, Koulouras V, et al. Prospective evaluation of post-implantation inflammatory response after EVAR for AAA: influence on patients' 30 day outcome. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* févr 2015;49(2):175-83.
239. Soares Ferreira R, Oliveira-Pinto J, Ultee K, Voûte MT, Oliveira NFG, Hoeks S, et al. Long Term Outcomes of Post-Implantation Syndrome After Endovascular Aneurysm Repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* oct 2021;62(4):561-8.
240. Bradley NA, Roxburgh C, Khan F, Guthrie G. Postimplantation syndrome in endovascular aortic aneurysm repair - a systematic review. *VASA Z Gefasskrankheiten.* avr 2021;50(3):174-85.
241. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 15 août 2003;374(Pt 1):1-20.
242. Chi L, Li Y, Stehno-Bittel L, Gao J, Morrison DC, Stechschulte DJ, et al. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* avr 2001;21(4):231-40.
243. May LT, Torcia G, Cozzolino F, Ray A, Tatter SB, Santhanam U, et al. Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 mars 1989;159(3):991-8.
244. Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;557:374-85; discussion 386-387.
245. Moulakakis KG, Alepaki M, Sfyroeras GS, Antonopoulos CN, Giannakopoulos TG, Kakisis J, et al. The impact of endograft type on inflammatory response after endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* mars 2013;57(3):668-77.
246. Storck M, Scharrer-Pamler R, Kapfer X, Gallmeier U, Görich J, Sunder-Plassmann L, et al. Does a postimplantation syndrome following endovascular treatment of aortic aneurysms exist? *Vasc Surg.* 2001;35(1):23-9.

247. Swartbol P, Truedsson L, Norgren L. Adverse reactions during endovascular treatment of aortic aneurysms may be triggered by interleukin 6 release from the thrombotic content. *J Vasc Surg.* oct 1998;28(4):664-8.
248. Swartbol P, Truedsson L, Pärsson H, Norgren L. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 release from white blood cells induced by different graft materials in vitro are affected by pentoxifylline and iloprost. *J Biomed Mater Res.* 5 sept 1997;36(3):400-6.
249. Gerasimidis T, Sfyroeras G, Trellopoulos G, Skoura L, Papazoglou K, Konstantinidis K, et al. Impact of endograft material on the inflammatory response after elective endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology.* 2005;56(6):743-53.
250. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J.* 21 sept 2017;38(36):2739-91.
251. McClure RS, Narayanasamy N, Wiegerinck E, Lipsitz S, Maloney A, Byrne JG, et al. Late outcomes for aortic valve replacement with the Carpentier-Edwards pericardial bioprosthesis: up to 17-year follow-up in 1,000 patients. *Ann Thorac Surg.* mai 2010;89(5):1410-6.
252. Dvir D, Bourguignon T, Otto CM, Hahn RT, Rosenhek R, Webb JG, et al. Standardized Definition of Structural Valve Degeneration for Surgical and Transcatheter Bioprosthetic Aortic Valves. *Circulation.* 23 janv 2018;137(4):388-99.
253. Capodanno D, Petronio AS, Prendergast B, Eltchaninoff H, Vahanian A, Modine T, et al. Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: a consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 1 déc 2017;38(45):3382-90.
254. Teshima H, Hayashida N, Yano H, Nishimi M, Tayama E, Fukunaga S, et al. Obstruction of St Jude Medical valves in the aortic position: histology and immunohistochemistry of pannus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* août 2003;126(2):401-7.
255. Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Rezvova MA, Ovcharenko EA, Glushkova TV, Kutikhin AG. Degeneration of Bioprosthetic Heart Valves: Update 2020. *J Am Heart Assoc.* 6 oct 2020;9(19):e018506.
256. Kulik A, Masters RG, Bédard P, Hendry PJ, Lam BK, Rubens FD, et al. Postoperative lipid-lowering therapy and bioprosthesis structural valve deterioration: justification for a randomised trial? *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* janv 2010;37(1):139-44.
257. Eishi K, Ishibashi-Ueda H, Nakano K, Kosakai Y, Sasako Y, Kobayashi J, et al. Calcific degeneration of bioprosthetic aortic valves in patients receiving steroid therapy. *J Heart Valve Dis.* nov 1996;5(6):668-72.
258. Sénémaud J, Coscas R, Alsac JM, Castier Y, Pellenc Q, Michel JB. Behind the Scenes of Disappointing Long Term EVAR Results: Pathophysiological Insights and Future Research Leads. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* déc 2020;60(6):954-5.

Annexes

Annexe I: Research letter, Behind the Scenes of Disappointing Long Term EVAR Results: Pathophysiological Insights and Future Research Leads, EJVES, Dec 2020

Auteurs: Jean Sénémaud 1 , Raphael Coscas 2 , Jean-Marc Alsac 3 , Yves Castier 4 , Quentin Pellenc 4 , Jean-Baptiste Michel 5

1 Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France; LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France.

2 LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France; Department of Vascular Surgery, Ambroise Paré University Hospital, Boulogne-Billancourt, France; UMR 1018, Inserm-Paris11 - CESP, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

3 Department of Vascular and Endovascular Surgery, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France; INSERM U970 - PARCC, Paris, France.

4 Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France; LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France.

5 LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France

RESEARCH LETTER: FOR DEBATE**Behind the Scenes of Disappointing Long Term EVAR Results: Pathophysiological Insights and Future Research Leads**

In their recent meta-analysis, Antoniou *et al.* confirmed the loss of early benefit during late follow up after endovascular aortic repair (EVAR), reporting increased rates of aneurysm rupture and secondary interventions compared with open repair.¹ Such disappointing long term results raise concerns about patient selection and EVAR durability, despite technical refinements. One of the main recent advances in understanding abdominal aortic aneurysm (AAA) pathophysiology was the evidence of a predominant role of the intraluminal thrombus (ILT) as a major driving force for AAA progression towards rupture. In this context, ILT is not only platelet activation, fibrin network formation, and fibrinolysis, but a more complete clotting process, including circulating cell entrapment (polymorphic neutrophils, platelets, red blood cells) along with oxidative processes inhibiting stromal cell colonisation, thus impeding spontaneous healing of the AAA wall.²

The objectives of EVAR include AAA exclusion and intrasaccular thrombosis, ultimately leading to aneurysm sac healing and shrinkage. It should be noted that the covered, self expanding stent grafts used in EVAR do not directly target such biological mechanisms.

Exclusion of the AAA after EVAR is assessed using imaging (computed tomography scans and/or duplex ultrasound sonography according to the patient's individual risk³) reporting AAA measurements and the existence of endoleaks. However, these criteria do not directly reflect AAA healing. Interestingly, there is little evidence of histological findings showing aneurysm healing after EVAR in human and animal studies. The paucity of post mortem studies and complexity of large animal AAA models may explain such a limited body of evidence. This supports the ongoing interest in large animal AAA models to allow the development of new, bio-active stent grafts that will have the triple actions to mechanically exclude the aneurysmal sac from the circulation therefore impairing intrasaccular clotting renewal, and finally to promote AAA wall healing (using fibrinolysis inhibitors and/or growth factor retention for example).

As a parallel to re-permeation of treated cerebral aneurysms after successful primary endovascular treatment, a significant proportion of patients treated by EVAR will present with endoleaks and/or aneurysm sac enlargement during follow up, highlighting the persistence of proteolytic activity within the AAA. Another research lead could be the development of functional imaging, able to assess the AAA's

biological activity after EVAR. The most advanced data in this field describe the relationship between fluorodeoxyglucose ([FDG] used as a tracer of high metabolic activity) uptake and AAA behaviour using positron emission tomography coupled with computed tomography (CT) scans (positron emission tomography [PET]/CT). Recent findings have reported that FDG uptake after EVAR was correlated with the absence of sac shrinkage,⁴ endoleaks and even rupture. However, the heterogeneity and the small sample sizes, along with the absence of standardised protocols limit the use of PET/CT in clinical practice.

A specific AAA pathophysiological target could be the ILT itself. In native AAA, the ILT is a dynamic, multilayered structure intimately entwined with the AAA wall, which includes a degraded media with few vascular smooth cells and elastic components associated with adventitial tertiary lymphoid organs, the latter reflecting the adaptive immune adventitial response.² In native AAA, the ILT luminal interface is permanently renewed by the flowing blood and the extent of haemostatic derangement (procoagulant activity and fibrinolysis) seems to be associated with the ILT. It is likely that after EVAR, the covered aortic stent grafts might slow down the biological activities of the intrasaccular clot and decrease tensional stress due to blood pressure and dilation within the sac, by separating the aneurysmal sac from the aortic flow. In contrast, consumptive coagulopathy and increase of sac and aneurysm volume, potentially leading to rupture, can be observed in the early stage after thoraco-abdominal aortic repair using multilayer flow modulators (Fig. 1), illustrating the role of the ILT. Though no biomarker is strongly correlated with endoleaks to date, the ILT morphology could be of interest during follow up. It is notable that the absence of shrinkage after EVAR is associated with the presence of active thrombus lacking cell re-colonisation and extracellular matrix healing, even years after EVAR.⁵ Such "unorganised" or "unrepaired" thrombus seems to be associated with endoleaks,⁵ the latter being able to "refresh" intrasaccular thrombus activity and its oxidative and proteolytic impacts. Moreover, ILT volume may play a role in AAA sac enlargement and type II endoleak occurrence after EVAR.⁵ In the setting of type II endoleaks, the objectives would be to suppress this insidious ILT renewal, to counter its biological activities (including coagulation and plasmin activation), and to allow an initial colonisation of the ILT by mesenchymal cells thus promoting fibrotic healing.

In conclusion, pacification of the intrasaccular thrombus including control of its proteolytic and oxidative activities, blockage of its renewal, and AAA healing promotion may be the keys to fulfilling EVAR potential, highlighting the importance of further translational research.

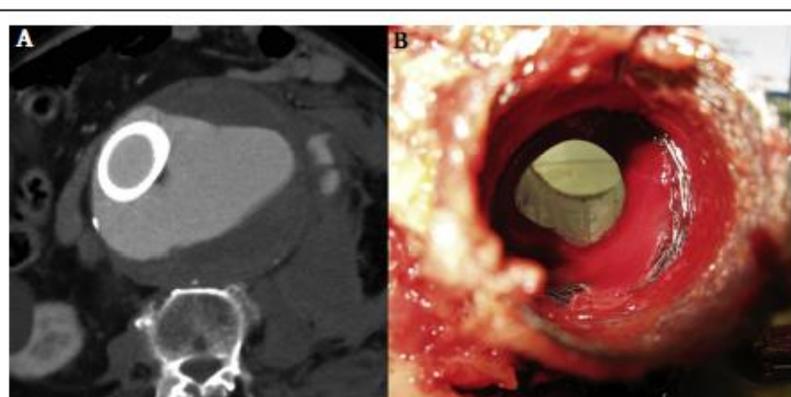


Figure 1. (A) Persistence of intraluminal flow in human abdominal aortic aneurysm after multilayer flow modulator (MFM) implantation on computed tomography scan. (B) Recent unorganised intraluminal thrombus surrounding an explanted MFM in another patient.

REFERENCES

- 1 Antoniou GA, Antoniou SA, Torella F. Editor's Choice – endovascular vs. open repair for abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of updated peri-operative and long term data of randomised controlled trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2020;59:385–97.
- 2 Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kulvaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, et al. Abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:34.
- 3 Wanhainen A, Verzini F, Van Herzele I, Allaire E, Bown M, Cohnert T, et al. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 clinical practice guidelines on the management of abdominal aorto-iliac artery aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2019;57:8–93.
- 4 Marie PY, Plissonnier D, Bravetti S, Coscas R, Rouer M, Haulon S, et al. Low baseline and subsequent higher aortic abdominal aneurysm FDG uptake are associated with poor sac shrinkage post endovascular repair. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2018;45:549–57.
- 5 Cornelissen SA, Verhagen HJ, van Herwaarden JA, Vonken EJ, Moll FL, Bartels LW. Lack of thrombus organization in non-shrinking aneurysms years after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2012;56:938–42.
- 6 Fujii T, Banno H, Kodama A, Sugimoto M, Akita N, Tsuruoka T, et al. Aneurysm sac thrombus volume predicts aneurysm expansion with type II endoleak after endovascular aneurysm repair. *Ann Vasc Surg* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2019.11.045> [in press].

Jean S enemaud*

Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France
LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France

Raphael Coscas

LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France
Department of Vascular Surgery, Ambroise Par e University Hospital, Boulogne-Billancourt, France
UMR 1018, Inserm-Paris11 – CESP, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

Jean-Marc Alsac

Department of Vascular and Endovascular Surgery, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France
INSERM U970 – PARCC, Paris, France

Yves Castier

Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France
LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France

Quentin Pellenc

Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France
LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France

Jean-Baptiste Michel

LVTS U1148, Xavier Bichat University Hospital, Paris, France

*Corresponding author. Department of Vascular and Thoracic Surgery, Xavier Bichat University Hospital, 46 rue Henri, Huchard 75018 Paris, France.

Email-address: jeanmichel.senemaud@aphp.fr (Jean S enemaud)

Available online 2 August 2020

  2020 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2020.06.029>

Annexe II: Research letter, Molecular Imaging of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms Targeting Vascular Homeostasis Disruption via CD31 Shedding, EJVES, Dec 2022

Auteurs: Jean N Sénémaud ¹ , Charles Skarbek ² , Jonathan Vigne ³ , Francois Rouzet ⁴ , Yves Castier ⁵ , Giuseppina Caligiuri ⁶

¹ Department of Vascular Surgery, Bichat University Hospital, Paris, France; Université de Paris, Paris, France; Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France.

² Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France.

³ Université de Paris, Paris, France; Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France; Nuclear Medicine Department, Bichat University Hospital, Paris, France.

⁴ Université de Paris, Paris, France; Nuclear Medicine Department, Bichat University Hospital, Paris, France.

⁵ Department of Vascular Surgery, Bichat University Hospital, Paris, France; Université de Paris, Paris, France.

⁶ Université de Paris, Paris, France; Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France.

RESEARCH LETTER

Molecular Imaging of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms Targeting Vascular Homeostasis Disruption via CD31 Shedding

Jean N. Sénémaud ^{a,b,c,*}, Charles Skarbak ^c, Jonathan Vigne ^{b,c,d}, François Rouzet ^{b,d}, Yves Castier ^{a,b}, Giuseppina Caligiuri ^{b,c}^a Department of Vascular Surgery, Bichat University Hospital, Paris, France^b Université de Paris, Paris, France^c Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France^d Nuclear Medicine Department, Bichat University Hospital, Paris, France

CD31 is a constitutive regulatory receptor that has crucial functions in the maintenance of homeostasis at the blood–vessel interface. Its loss at the surface (shedding) of both circulating and aneurysm infiltrated immune cells is a characteristic feature of patients presenting with abdominal aortic aneurysms (AAAs).¹ The use of a novel radiolabelled peptide targeting CD31^{shed} cells (P8RI; a synthetic CD31 agonist) at sites of active tissue inflammation has previously been developed and validated.² The present study sought to identify the presence of active inflammatory loci in an experimental animal model of progressive AAAs using single photon emission computed tomography (SPECT) imaging and Tc^{99m} labelled D-P8RI.

This study received local ethics committee approval (#4351). Experimental AAAs were created in adult male Wistar rats (9 weeks old) by an intra-aortic infusion of porcine pancreatic elastase (3 units in 800 µL NaCl 0.9% solution [Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA]) using a pressure perfusion pump for 30 minutes. Intra-aortic infusion of saline solution alone (800 µL NaCl 0.9%) was performed similarly in sham operated (control) animals. Persistent inflammation at the site of all experimental AAAs allowing continuous growth was ensured by iterative bacteraemia, as previously described.³ An independent operator performed ultrasound assessment of the experimental AAAs four weeks after their induction (VisualSonics Vevo 2100, Fuji-film, Japan). Contrast enhanced computed tomography (CT) was also performed four weeks post-AAA induction under general anaesthesia, immediately before SPECT imaging, to allow for anatomical co-registration (Fig. 1A). Eighteen Wistar rats were included in the study. The radiolabelled Tc^{99m}-HYNIC-P8RI (rP8RI) was injected intravenously at a dose of 80 ± 10 MBq in 300 µL saline solution in AAA (*n* = 6) and sham operated rats (*n* = 6). An irrelevant peptide coupled to Tc^{99m}-HYNIC (rIP, 74 ± 8 MBq in 300 µL saline solution) was injected in a parallel AAA group (*n* = 6) for tracer specificity control. Images were acquired after 30 minutes (to allow biodistribution of the tracer), using the NanoSPECT/CT workstation (Mediso, Budapest, Hungary).

SPECT images were reconstructed using Tera-Tomo software (Mediso). Manual segmentation allowed for the creation of volume of interest (VOI) in which the intensity of radioactivity was measured and normalised as Bq/mm³ in the infrarenal and suprarenal aortic segments. Immediately after SPECT imaging, the animals were euthanised, and the hearts and abdominal aortas were harvested for *ex vivo* gamma counting (β -Imager; Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France). Gamma counting measures of the heart and aortas were expressed as a ratio (i.e., radioactivity count in the infrarenal abdominal aorta relative to the heart per mass units) for data normalisation allowing intergroup comparison. Statistical analyses were performed using SAS software (version 9.4; SAS Institute, Cary, NC, USA). Tests were considered to be statistically significant if they had a *p* value of < .050.

Four weeks after AAA induction, the mean maximum diameter of the infrarenal aorta in the AAA groups was dramatically increased vs. the sham group (5.9 ± 1.2 mm vs. 1.3 ± 0.2 mm; *p* = .002). In parallel, SPECT imaging showed a consistently high mean radioactivity count in the infrarenal aortic VOI in the AAA group injected with rP8RI (172 ± 55 Bq/mm³; Fig. 1B). The signal obtained with rP8RI was specific, as shown by the comparison with the AAA group in which the animals were injected with the rIP (signal 84 ± 18 Bq/mm³; *p* = .008). Furthermore, the mean signal obtained in the infrarenal aorta upon injection of the rP8RI was statistically significantly higher in the AAA group compared with the sham group (93 ± 20 Bq/mm³; *p* = .005). Data from the *ex vivo* gamma counting confirmed the specificity of the signal: the abdominal aorta/heart ^{99m}Tc counts ratio was statistically significantly higher in the AAA group after rP8RI injection (20% ± 5%) compared with the other groups (sham: 7% ± 4% [*p* = .007]; AAA injected with rIP: 6% ± 2% [*p* = .005]).

In clinical practice, AAAs are kept under surveillance and repaired if the diameter threshold of 55 mm has been reached. However, standard CT imaging is unable to identify rapidly growing AAAs or to stratify the risk of aortic rupture.

* Corresponding author. Service de Chirurgie Vasculaire, Thoracique et de Transplantation Pulmonaire, Centre Hospitalier Universitaire Bichat – Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard 75018 Paris, France.

E-mail address: jeannicolas.senemaud@sphp.fr (Jean N. Sénémaud).

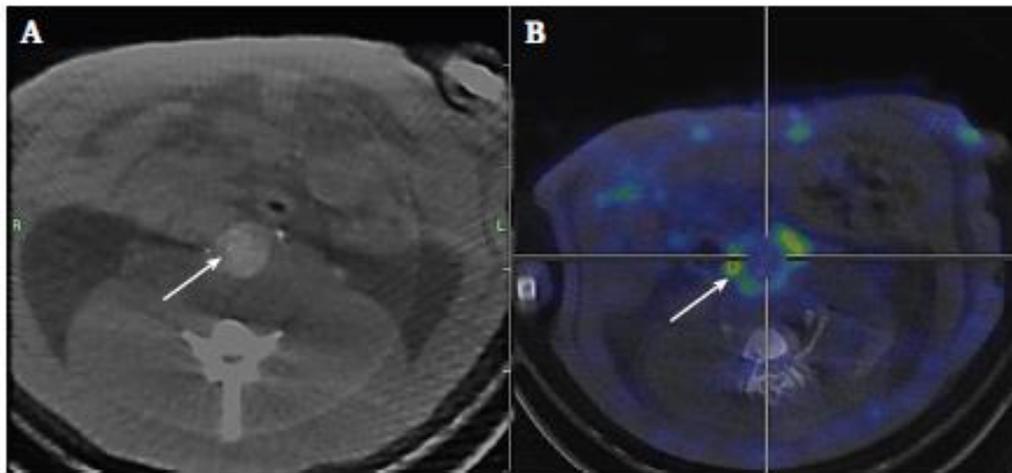


Figure 1. (A) Contrast enhanced abdominal computed tomography scan showing an experimental abdominal aortic aneurysm generated four weeks after intra-aortic infusion of porcine pancreatic elastase in a Wistar rat. (B) Single photon emission computed tomography imaging showing rP8RI uptake in the aortic wall, in the same rat.

This led to the development of functional imaging to explore AAA pathophysiological pathways. Its figurehead, positron emission tomography, is able to target hypermetabolic cells through fluorodeoxy-glucose-F18 (18F-FDG) intake quantification but fails to provide information on cell type or its phenotype, explaining contradictory findings between 18F-FDG uptake and human AAA growth.⁴ Therefore, a novel approach targeting AAA immune cells may allow the identification of high intensity inflammatory profiles in small AAAs. Currently, there is no pharmaceutical strategy to reduce small AAA growth in humans.⁵ The CD31 pathway could be a promising therapeutic lead as recent studies have shown that the loss of CD31 is also associated with aneurysmal progression upon dissection in patients and mice.⁶ Interestingly, the systemic administration of P8RI favoured the healing of experimental dissected aortas in mice.⁶ The imaging and therapeutic potential of CD31 requires further translational research on the role of CD31 in human AAA pathophysiology.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT AND FUNDING

None.

REFERENCES

- 1 Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory CD31⁺ T cells in patients with

atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:618–23.

- 2 Vigne J, Bay S, Aké-Launais R, Pariscoat G, Rucher G, Senemaud J, et al. Cleaved CD31 as a target for *in vivo* molecular imaging of inflammation. *Sci Rep* 2019;9:19560.
- 3 Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, et al. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One* 2011;6:e18679.
- 4 Jalalzadeh H, Indrakusuma R, Planken RN, Legemate DA, Koelemay MJ, Balm R. Inflammation as a predictor of abdominal aortic aneurysm growth and rupture: a systematic review of imaging biomarkers. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016;52:333–42.
- 5 Kokje VB, Hamming JF, Lindeman JH. Editor's Choice – Pharmaceutical management of small abdominal aortic aneurysms: a systematic review of the clinical evidence. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015;50:702–13.
- 6 Andreatta F, Syvannarath V, Clement M, Delbosc S, Guedj K, Fomasa G, et al. Macrophage CD31 signaling in dissecting aortic aneurysm. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:45–57.

Keywords:

Aneurysm imaging, CD31, Experimental abdominal aortic aneurysms, Immunology, SPECT/CT, Vascular biology

Available online 6 October 2022

© 2022 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2022.10.004>

Annexe III: Article original (soumis): Camouflaging Endovascular Stents With an Endothelial Coat Using CD31 Domain 1 Mimetic Peptides, Biomimetics, soumis le 27 Septembre 2023.

Auteurs: Jean Sénémaud 1,2,3, Charles Skarbek 2,3, Belen Hernandez 3,4, Ran Song 5, Zhongcheng Pan 5, Isabelle Lefevre 6, Elisabetta Bianchi 7, Yves Castier 1, Antonino Nicoletti 2,3, Christophe Bureau 5,6*, Giuseppina Caligiuri 2,3,8

1 Department of Vascular Surgery, Bichat University Hospital, Paris, France

2 Université Paris Cité, France

3 Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France

4 Université Sorbonne Paris Nord, France

5 Sino Medical Sciences Technology Inc., Tianjin, China

6 AlchiMedics S.A.S., Paris, France

7 Peptide Chemistry Unit, Peptides & Small Molecules R&D Department, IRBM SpA, Pomezia (Roma), Italy

8 Department of Cardiology, Bichat University Hospital, Paris, France

Camouflaging Endovascular Stents With an Endothelial Coat Using CD31 Domain 1 Mimetic Peptides

Jean Sénémaud, Charles Skarbek , Belen Hernandez , Ran Song , Zhongcheng Pan , Isabelle Lefevre , Buommino Elisabetta , Yves Castier , Antonino Nicoletti , Christophe Bureau , Giuseppina Caligiuri *

Posted Date: 28 September 2023

doi: [10.20944/preprints202309.2003.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202309.2003.v1)

Keywords: CD31 interactions; Endovascular stents; camouflage strategy; circulatory homeostasis; device integration



Article

Special Issue "Biomaterials for Cardiovascular Repairs and Cardiovascular Biomechanics".

Camouflaging Endovascular Stents with an Endothelial Coat Using CD31 Domain 1 Mimetic Peptides

Jean Sénémaud^{1,2,3,†}, Charles Skarbek^{2,3,†}, Belen Hernandez^{3,4}, Ran Song⁵, Zhongcheng Pan⁵, Isabelle Lefevre⁶, Elisabetta Bianchi⁷, Yves Castier¹, Antonino Nicoletti^{2,3}, Christophe Bureau^{5,6,†} and Giuseppina Caligiuri^{2,3,8,*},†

¹ Department of Vascular Surgery, Bichat University Hospital, Paris, France

² Université Paris Cité, France

³ Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148, Paris, France

⁴ Université Sorbonne Paris Nord, France

⁵ Sino Medical Sciences Technology Inc., Tianjin, China

⁶ AlchiMedics S.A.S., Paris, France

⁷ Peptide Chemistry Unit, Peptides & Small Molecules R&D Department, IRBM SpA, Pomezia (Roma), Italy

⁸ Department of Cardiology, Bichat University Hospital, Paris, France

* Correspondence: giuseppina.caligiuri@inserm.fr; Tel: +33 1 40 25 75 56

† equally contributed.

Abstract: Background: Implantation of an endovascular device disrupts the homeostatic CD31:CD31 interactions among quiescent endothelial cells, platelets, and circulating leukocytes. The aim of this study was to mask endovascular stents with peptides imitating CD31, to mimic the device's surface to resemble that of a healthy vascular endothelium. **Methods:** Peptide design relied on established trans-homophilic sequences found within domains 1 and 2 of CD31. Subsequently, synthetic peptides were immobilized onto flat CoCr and nitinol discs and their impact on the primary human arterial endothelial cell phenotype was evaluated in vitro. Following this, clinical-grade CoCr and nitinol endovascular devices were coated with one of the peptides that demonstrated the capability to induce a pro-physiologic endothelial phenotype, implanted in the arteries of rabbits, and compared to uncoated controls. **Results:** Membrane-distal CD31 domains 1 and 2 peptides exhibited a distinct capability to foster a healthy endothelial phenotype in vitro. By day 7 post-aortic implantation, CoCr stents were evenly covered by wholesome endothelial cells, devoid of thrombo-inflammatory signs, in contrast to both bare metal and drug-eluting stents. At day 60, nitinol-coated flow diverters demonstrated enhanced performance in comparison to the control groups for excluding experimental carotid aneurysms, facilitating the formation of a seamless "neo-arterial" wall. **Conclusion:** Membrane-distal CD31 biomimetic peptides effectively camouflage the device surface, preventing local reactions and promoting rapid and seamless endovascular integration.

Keywords: CD31 interactions; endovascular stents; camouflage strategy; circulatory homeostasis; device integration

Introduction

The introduction of endovascular devices during percutaneous arterial interventions disrupts the homeostatic molecular crosstalk between the bloodstream platelets, leukocytes, and vascular endothelial cells. Disruption of these essential cell-cell interactions triggers a pathogenic thrombo-inflammatory response, leading to the development of life-threatening complications over an extended period. While drug-eluting stents can mitigate the inflammatory and proliferative responses, they also impede arterial healing, necessitating a prolonged regimen of dual antiplatelet

therapy to counteract the heightened risk of thrombosis [1].

Given that thrombotic complications associated with drug-eluting stents consistently arise due to the cytotoxic effect of released drugs on endothelial cells, perpetrating exposure of the device surface to blood clotting factors, a range of strategies have been explored to enhance endothelial cell adherence to endovascular devices. These strategies include the application of surfaces coated with agents capable of capturing endothelial cell progenitors, as well as the development of biomimetic surfaces inspired by well-known endothelial cell supports such as fibrin or extracellular matrix.

However, although these strategies effectively promote endothelial cell adherence to device surfaces, their anticipated benefits have not been realized, neither for CoCr in coronary stenosis [2] nor for flow diverters in the treatment of cerebral aneurysms [3].

Interestingly, relying solely on endothelial adherence may prove to be inadequate. Rapid and comprehensive endothelial coverage is achieved on bare metal stents, yet their efficacy is hampered by persistent chronic thromboinflammatory local responses that lead to restenosis. Notably, the activation of leukocytes and platelets upon contact with the device can persist, despite the presence of adhered endothelial cells. This discrepancy underscores the need for a more nuanced understanding of the intricate interactions between the device and the cardiovascular tissue.

Endothelial cells play a critical role in executing essential physiological functions, including anti-inflammatory and antithrombotic processes. However, for these cells to effectively fulfill their roles, appropriate signaling cues are required.

CD31, also known as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), is central to this context. This intricate glycoprotein is predominantly expressed by endothelial cells, and to a lesser extent, by circulating leukocytes and platelets. CD31 plays a pivotal role in circulatory homeostasis, driven by its trans-homophilic properties that regulate immune responses during cell-cell interactions, maintain vascular integrity, and support appropriate hemostasis [4]. These critical homeostatic properties of CD31 make it a prime candidate for inspiring innovative biomimetic approaches capable of redefining the integration of endovascular devices and driving progress in cardiovascular medicine.

We aimed to harness the characteristics of CD31 membrane-distal domains 1 and 2 to "camouflage" endovascular devices, thereby augmenting biocompatibility and fostering seamless integration within the cardiovascular system.

The physiological cell-cell CD31 interaction within the circulatory system is primarily based on its membrane-distal domains 1 and 2, which, under physiological conditions, engage in trans-homophilic and reciprocal homeostatic signaling upon contact [5,6]. Indeed, the substantial exposure of these domains on the luminal aspect of the endothelium also provides a means for homeostatic cell-cell interaction with circulating platelets and leukocytes, significantly contributing to the endothelium's anti-inflammatory and antithrombotic characteristics.

Guided by these insights, we present an innovative approach that involves "camouflaging" stents and flow diverters through the application of peptides emulating CD31 domains 1 and 2. By adopting this strategy, the devices can be perceived as integral components of the healthy endothelium by cells that interact with their surfaces. This transformation masks the foreign identity of these devices, with the overarching goal of mitigating adverse local reactions at the implantation site and expediting more seamless and effective integration of these devices within the intricate cardiovascular milieu.

Materials and Methods

Peptides design

The biomimicking peptides inspired by human CD31 trans-homophilic interactions were designed based on the structural characterization of domains 1-2 and their strand-swapped dimer formation observed upon CD31 crystallization, as described by Paddock et al [5]. The substantial IgD1/IgD1 interface and interdomain contacts between IgD1/IgD2 and IgD2/IgD2 provided critical information to inform the development of these peptides, with the aim of enhancing and replicating

the cell–cell trans-homophilic interactions crucial for CD31 intercellular functions. The designed peptides were divided into four groups, referred to as Group I, Group II, Group III, and Group IVa/b.

Group I peptides were designed to mimic the region of human CD31 IgL1 spanning His71-Ser87 or Gln70-Lys89. Homocysteines Gln70hCys and Met88hCys were incorporated to form a disulfide bond and a cyclic structure. The consensus sequence QHXXLFYKDDXXFYNISSXX was derived, with certain amino acids allowing for variation. The following peptides were included in Group I: SP722, SP745, SP765, SP1374, and SP1375.

Group II peptides were designed to imitate the region of human CD31 IgL1 corresponding to Tyr107-Glu122 or 106-124 aa. The mutated 106hCys and 124hCys homocysteines enabled the cyclic formation. The consensus sequence YKSTVIXNNKEKTTXE was established with specific amino acid variations in the individual peptides. Group II peptides included SP1072 and SP1376.

Group III peptides were created to mimic the region of human CD31 IgL2 from Pro133-Lys158. Val135hCys and Cys152hCys were introduced to form disulfide bonds and cyclic structures. The consensus sequence, PXCTLDKKEIXIQQGXVXVNCVPEEK, was developed, with particular amino acids allowing for variability. The peptides in Group III included SP1071 and SP1380.

Group IVa peptides consist of heterodimers, combining peptides from Group II and Group I through covalent linkage. Group IVb peptides were also heterodimers, combining peptides from Group III and Group I. Peptides SP1379 and SP1383 were part of Groups IVa and IVb, respectively.

Peptides synthesis, structural analysis

All peptides were synthesized using standard Solid-phase Peptide Synthesis protocols with Fmoc/t-Bu chemistry and Dimethylformamide as the solvent. Due to their high sequence similarity, the individually designed peptides were screened in vitro to identify potential candidates for coating stents in future in vivo applications, based on their proven ability to induce a pro-physiological phenotype in endothelial cells.

To assess their structural similarity to the endogenous protein from which the sequences were derived, the peptides were dissolved in a phosphate buffer (pH 6.8) at a concentration of 5 mM. Raman spectra were acquired by exciting ~50 μL of the sample solutions in Suprasil quartz cells (5 mm path length) using the 488 nm line emitted by an Ar⁺ laser (Spectra Physics). Scattered light was analyzed using a Jobin-Yvon T64000 spectrograph, equipped with a 1200 grooves/mm holographic grating and a holographic notch filter, operating in a single macro configuration. The effective spectral slit width was set at ~5 cm^{-1} .

The coating process for all samples, including NiTi and CoCr disks and stents, followed a three-step dip-coating protocol using copper-free click chemistry. Demineralized water and Tris buffer (10 mM, pH 8.5) served as solvents and buffers. Polydopamine (PDA) at 2 mg/mL (prepared in 10mM Tris buffer, pH 8.5, from dopamine hydrochloride) and DBCO (final concentration of 300 μM , derived from a 20 mg/mL stock solution in 10mM Tris buffer, pH 8.5) were used. CD31 peptide was introduced at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sample coating

The dip-coating process took place in multiwell plates on an orbital shaker for disks, while stents were placed in polypropylene round-bottom tubes on a rotary wheel, ensuring complete immersion. The PDA layer dip coating step lasted approximately 18 ± 2 hours at room temperature (protected from light). Afterward, samples underwent three rinses with demineralized water, followed by sonication to remove any residual PDA. Subsequently, samples were transferred to fresh wells/tubes containing DBCO (300 μM) and incubated overnight with continuous rotation. After another round of rinsing and sonication, samples were placed in wells/tubes containing CD31 peptide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 2 hours with continuous rotation. After the final rinse, samples were briefly immersed in absolute ethanol for 5 seconds and air-dried. Each item underwent a thorough inspection for flawless sample coating using high-magnification 3D light microscopy (Keyence VHX-7000N) to confirm the effectiveness and completeness of the coating.

Screening in vitro

Distinct CD31 peptide coatings' impact on primary Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) was assessed through in vitro screening. Mirror-polished nitinol disks (4.8 mm diameter, 0.15 mm thickness) underwent sequential dip-coating, either remaining bare or receiving peptide coatings. Primary Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) were cultured on these disks for 48 hours using basal Endothelial Cell Basal Medium MV2 (Lonza), excluding growth factors.

After incubation, adherent cells on disks were rinsed, fixed, and stained. Staining included phalloidin-AlexaFluor®488 for F-actin, DAPI for DNA, and CD31 domain 1 antibody (clone 9G11)-allophycocyanin (APC) for CD31. Fluorescent elements were imaged using an Axio Observer microscope with Zeiss Zen software and analyzed using Image J® (NIH) with the "Analyze Particles" function.

Peptides from the 5 groups underwent batch testing, and individual peptide effects were assessed across multiple experiments. Bare metal as well as discs coated with the polymer only (PDA) or a peptide targeting the cis-homophilic, juxta-membrane segment, of CD31 (P8RI [7,8]) were used as controls. Adherent elements were quantified as N/mm², and positive staining was assessed via integrated density (IntDens). A physiological endothelial phenotype was indicated by low intracellular F-actin and strong CD31 expression at cell borders, presented as CD31/Actin ratios on a Y-axis scaled from 0 to 1 using the formula $(x - \min) / (\max - \min)$.

To comprehensively assess the impact of different CD31 peptide coatings on endothelialization potential, parallel scratch tests were performed. Coatings were applied to culture well bottoms, and real-time cell migration was tracked using an Incucyte S5® system, providing insights into the influence of various CD31 peptide coatings on endothelial cell migration.

Studies in vivo

The peptide SP1072 (Group II, sequence: YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N3)-CONH₂), chosen from those exhibiting a robust CD31/Actin ratio in vitro with HAEC, was used to coat clinical grade devices (nitinol flow diverters -FD- and CoCr stents).

All in vivo procedures described in this study were conducted by PharmaLegacy Diagnostics Co. Ltd., a biotechnology research service based in Shanghai (project #PLJC22-0005). All procedures were carried out in male White New Zealand rabbits weighing 4.0 to 4.5kg, in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the People's Republic of China. Every effort was made to minimize the suffering of the animals and to ensure their welfare throughout the study. Rabbits were anesthetized using Acepromazine, Ketamine, and Xylazine, and post-operative analgesia was provided with Buprenorphine.

CoCr stents were successfully implanted within rabbit aortas and femoral arteries, whereas Nitinol flow diverters were positioned in the aortas and the subclavian right carotid artery, across an experimental saccular aneurysm generated using the elastase model 3 weeks before, as previously described [8,9]. Bare metal nitinol and CoCr devices and drug-eluting CoCr stents were used in the control groups. A minimum of 5 animals per group was included in each study.

At the time of implantation, only heparin sodium was given, to prevent acute thrombosis. Aspirin and Clopidogrel were given orally 2 days before all device implantation and pursued thereafter. A distinct experimental approach was used to evaluate the potential efficacy of the flow diverter while sparing antiplatelet therapy. In this iteration of the experiment, the experimental rabbits were not administered aspirin or any anti-P2Y₁₂ antiplatelet medication after implantation.

Follow-up was pursued as specified in the figure legends and up to 60 days. The luminal aspect of the arterial segments within the experimental framework was meticulously analyzed using scanning electron microscopy (SEM), whereas resin cross-sections were subjected to light microscopy for detailed assessment, as previously described [7,8].

Results

Synthetic Peptides Characterization

We synthesized a total of 51 peptides across five groups. The sequence positions corresponding to these peptides were modeled in silico based on the CD31 domains 1 and 2 trans-dimerization interface model described by Hu et al. [10]. Specific details for representative peptides from each group (SP1374 from Group I, SP1072 from Group II, SP1071 from Group III, SP1379 from Group IVa, SP1383 from Group IVb) are provided in **Table 1**. Their positions at the trans-homophilic interface of CD31-CD31 dimers are illustrated in **Figure 1** and an example of their structural characterization using Raman spectroscopy is presented in **Figure 2**.

Table 1. Details of the peptides from the different groups represented in figure 1

Peptide (Group)	Protein Region	Sequence	CD31 Domain
SP1374 (I)	Gln70-Lys89	1	QHQLMFYKDDVLFYNISSMK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-KN3-CONH2
SP1072 (II)	Tyr107-Glu122	1	YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N3)-NH2
SP1071 (III)	Pro133-Lys158	2	Ac-K(N3)-PEG4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-CONH2
SP1379 (IVa)	Thr106-Gln124 + Gln70-Lys89 (K8hC)	1 (dimer)*	[-CH2CO*-GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)4-K(N3)-NH2]-[QHQLMFY-hC*-DDVLFYNISSMK-NH2]
SP1383 (IVb)	Pro133-Lys158 + K8hC Gln70-Lys89	1-2 (dimer)*	[Ac-K(N3)-(Ttds)4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K(-CH2CO*)NH2]-[QHQLMFY-hC*-DDVLFYNISSMK-NH2]

* Dimers are obtained through a thioether linkage of the first sequence with the bromoacetyl group of the second sequence.

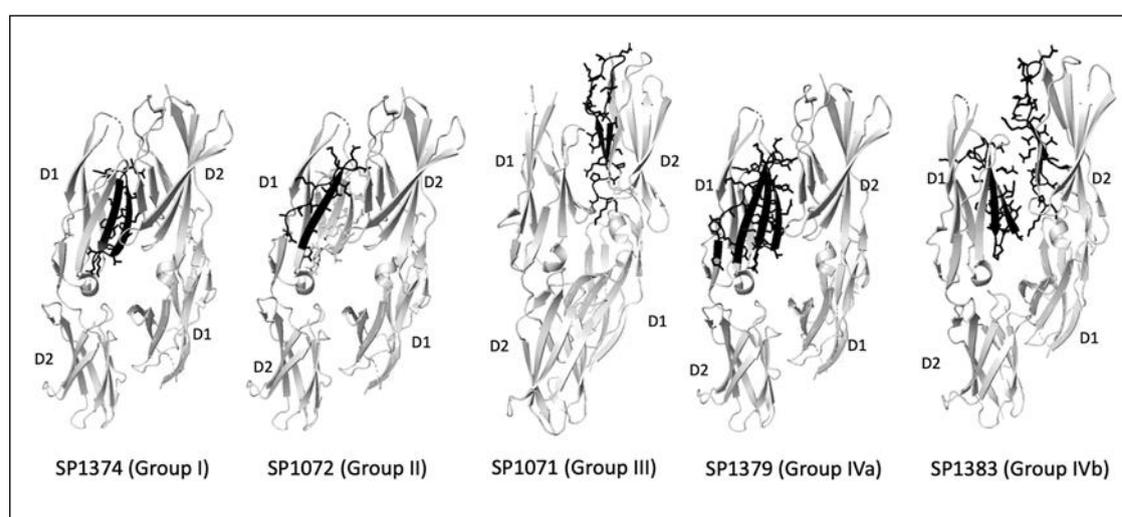


Figure 1. Localization of Representative Peptides within CD31 Domains 1 and 2. The positioning of representative peptides used in this study is illustrated within the trans-homophilic interacting sequences of CD31 domains 1 and 2 (D1 and D2). The CD31 protein sequence is presented in grey, while the peptide sequence is depicted in black. Groups I and II comprise peptides issued from D1. Group III comprises peptides issued from D2. Group IV includes dimers comprised either within domain 1 (Group IVa) or situated between D1 of one CD31 molecule and the trans-homophilic segment of D2 of another CD31 molecule (Group IVb).

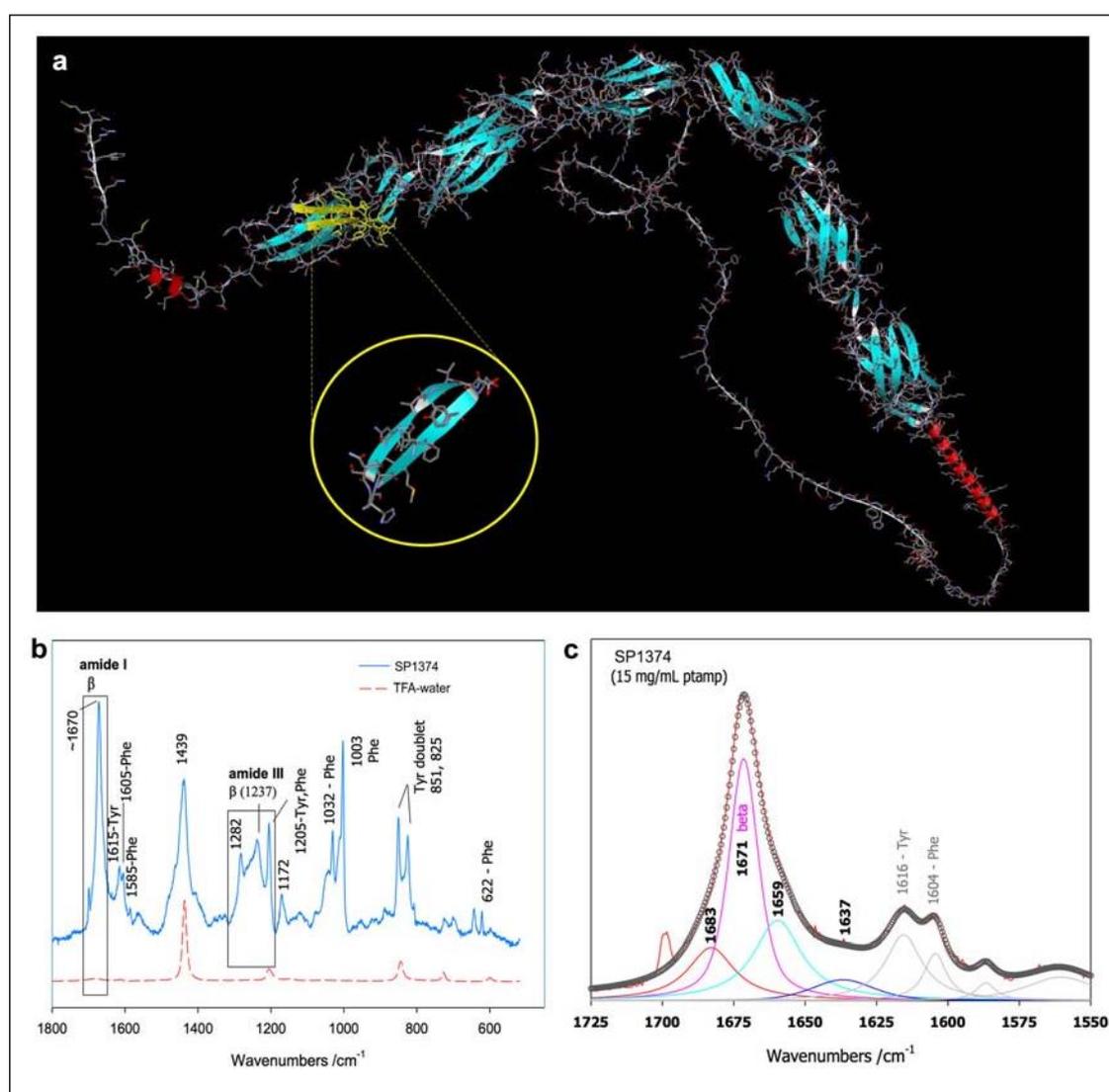


Figure 2. Structural Analysis of synthetic Peptides via Raman Spectroscopy. Representative example (SP1374) of peptide structural data obtained through Raman Spectroscopy. (a) Depicts the conformation of the peptide (highlighted within the yellow circle) as compared to its structure within the 3D model of human Pecan 1 (available at <https://alphafold.com/entry/P16284>). (b) Shows the Raman spectra in peptide solutions after solvent subtraction, with the TFA-water spectrum plotted in red. The regions used for structural diagnostics (Amide I, III) are outlined (boxes), along with characteristic vibrations of aromatic amino acid side chains. (c) Illustrates the decomposition of the Amide I region of peptide SP1374, revealing a highly structured species primarily composed of beta- type conformers organized in sheets (approximately 45%). The remaining contributions correspond to elements that facilitate connections between beta strands (beta-turns), segments adopting PPII conformations, 3-10 helices, or disordered segments at the chain termini.

Selection of the peptide to be used in vivo guided by the results of the screening in vitro

While all CD31 peptides consistently promoted a more physiological endothelial cell phenotype, indicated by an increased CD31/Actin ratio compared to bare metal discs, only the trans-homophilic peptides from domains 1 and 2, and not the cis-homophilic peptide from the juxtamembrane segment (P8RI) of CD31, significantly improved the physiological score compared to the polymer alone (PDA) in the in vitro screening (Figure 3). This suggests that the specific engagement of CD31 by P8RI was limited in this assay using resting endothelial cells, possibly due to steric hindrance—the cis-homophilic position of CD31 on the cells being obscured by the large mass of the six extracellular Ig-like domains of CD31. The best results were achieved by peptides from group II. From this pool, we

opted to proceed with SP1072 for coating clinical-grade nitinol flow diverters and CoCr stents due to its straightforward sequence, which implies a quicker and more straightforward scaling-up process. We also planned to conduct further in vivo testing.

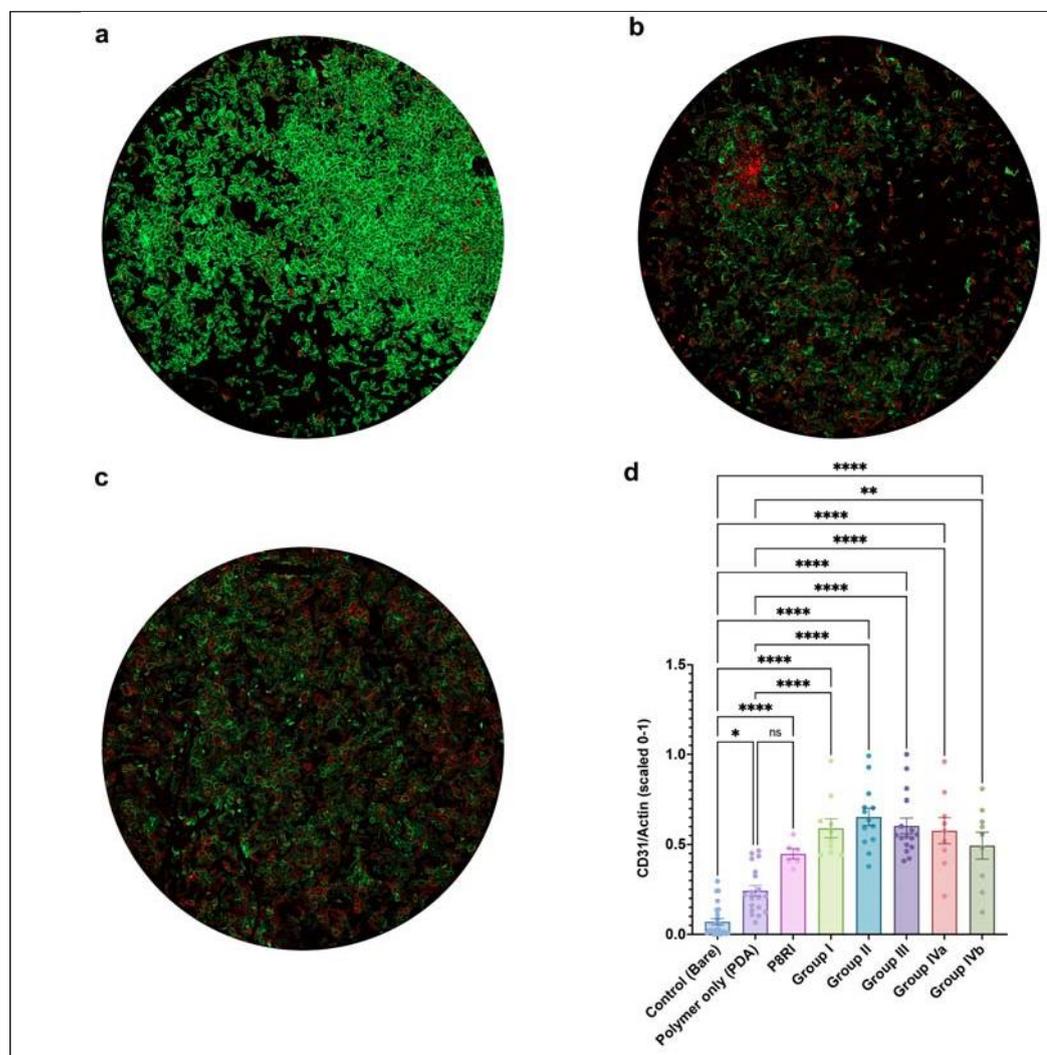


Figure 3. Assessment of Endothelial Cell Phenotype: CD31/Actin Ratio. (a) Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) adhering to bare metal surfaces exhibit a stressed phenotype characterized by extensive F-actin polymerization (green staining) and relatively low CD31 expression at the cell border. (b) Introduction of the anti-fouling and pro-adhesive polymer, PDA, improves the physiological score (CD31/Actin ratio) compared to bare metal support. However, CD31 expression remains uneven and variable in density across the endothelial layer. (c) The presence of trans-homophilic peptides derived from domain 1 of CD31 (illustrated here by SP1072 from Group II) consistently induces a physiological phenotype in contacting endothelial cells throughout the flat sample. (d) Statistical analysis shows differences between various peptides (pooled data from 2-3 batches, including data from 3-5 peptides per group, and P8RI) compared to bare metal and discs coated with the polymer only (PDA). ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Consistent in vivo efficacy of the camouflaging coating on two endovascular devices across animal models

CoCr stents coated with the selected CD31 peptide demonstrated superiority over both bare-metal and drug-eluting stents. By day 7, CD31-coated CoCr stents were entirely covered by a smooth endothelium, in contrast to drug-eluting and bare-metal stents which remained largely exposed to the flowing blood. Moreover, the endothelium covering the CD31-coated stents remained entirely "clean," unlike bare-metal stents which often displayed signs of local thrombo-inflammation over the endothelialised struts (refer to **Figure 4a**). The morphometric analysis of resin cross-sections

confirmed the complete absence of thrombo-inflammation on the luminal side of coated stents, as well as the absence of adventitial inflammatory reactions commonly observed with bare metal devices (**Figure 4b**).

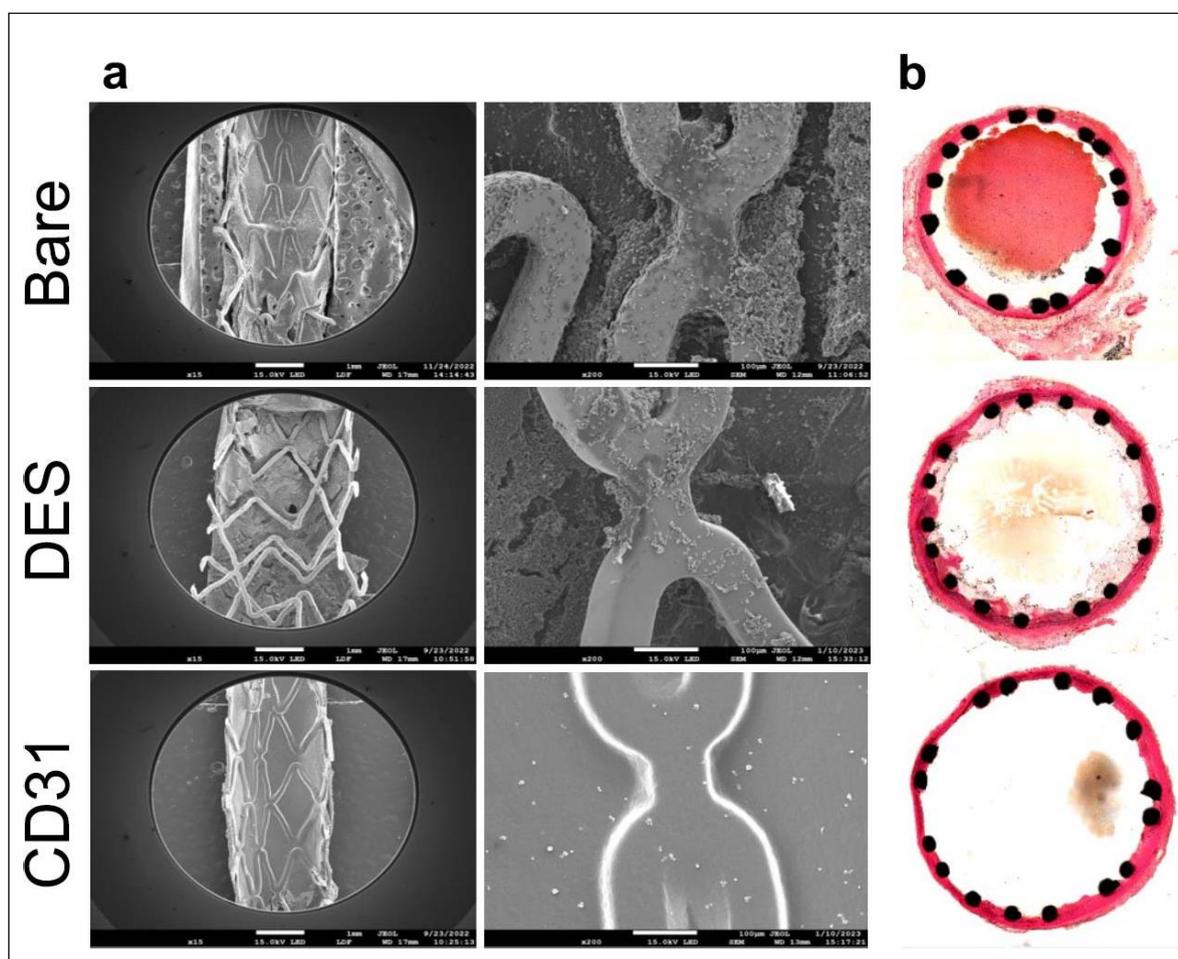


Figure 4. CD31 D1-Coated CoCr Stents Outperform Drug-Eluting and Bare-Metal Stents by Day 7 in terms of Endothelial Coverage and Thrombo-Inflammation. (a) Example of scanning electron microscopy (SEM) images of the luminal face of the rabbit abdominal aorta with CoCr stents: bare, DES (drug-eluting stents), and CD31 D1-coated stents, implantation occurred 7 days prior. On the right, a higher magnification view of the stent struts is displayed. (b) Representative hematoxylin and eosin-stained resin cross-sections from parallel groups.

In the elastase saccular aneurysm rabbit model, the results showed that flow diverters coated with the CD31-Domain 1 mimicking peptide SP1072 promoted a smooth integration of the devices under a physiologic confluence of endothelial cells. This resulted in the formation of a "neo-arterial" wall at the entrance of the aneurysmal sac, documented by "en face" scanning electron microscopy analysis. In contrast, the group implanted with control/bare metal flow diverters exhibited an open inter-strut space at the aneurysmal entry, even two months after implantation, as depicted in **Figure 5a**. Examination of resin cross-sections revealed that in the control group, fresh blood was still present in the sac (indicated by black asterisk), and flourishing periarterial inflammation was still visible even after two months (indicated by white asterisks). However, in the CD31 group, the arterial tissue appeared to have healed evenly, and the adventitia remained consistently "clean," as illustrated in **Figure 5b**. In the antiplatelet treatment sparing pilot study, all animals of the CD31 peptide arm were alive at 60 days, while 2 animals (40%) died in the reference arm.

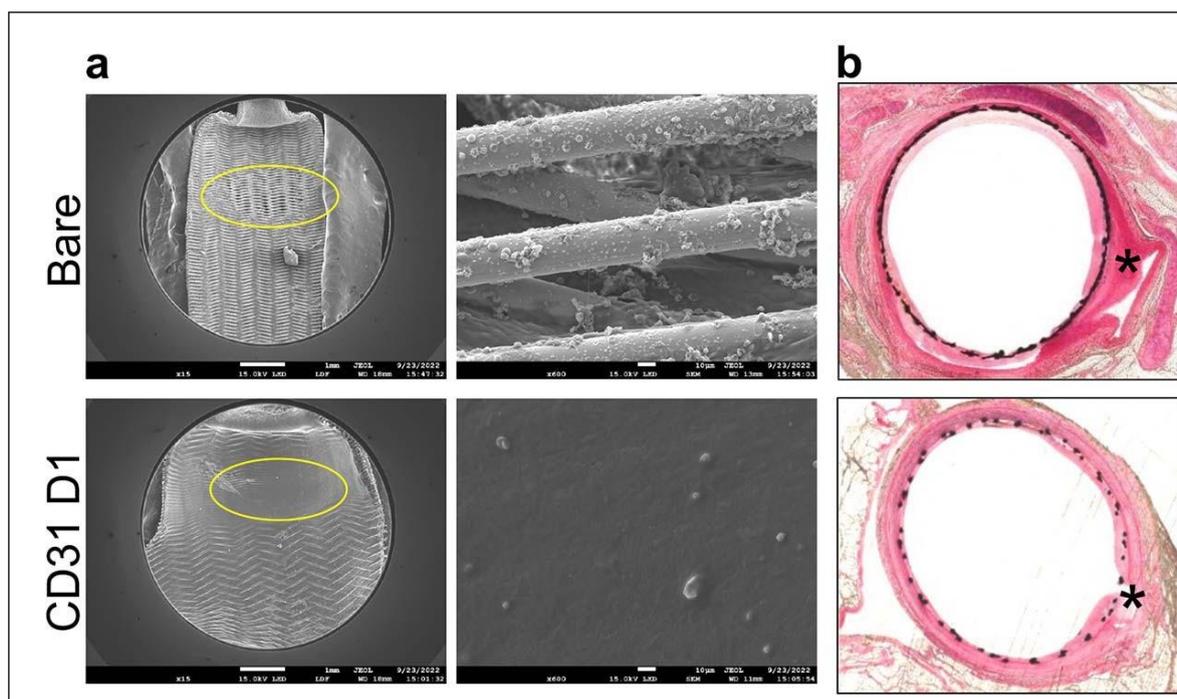


Figure 5. Impact of CD31-Domain 1 Peptide-Coated Flow Diverters on Aneurysm Wall Integration.

(a) "en face" analysis by scanning electron microscopy of the luminal side of carotid arterial segments hosting a saccular aneurysm, implantation of flow diverters occurred 2 months prior to analysis. On the right, a higher magnification view of the entry point of the aneurysmal sac is highlighted by the yellow ellipse. (b) Analysis by light microscopy, performed on parallel series of rabbits, utilizing hematoxylin-eosin staining, on cross sections of the carotid artery at the level of the aneurysmal sac entry. The location of the aneurysmal sac is denoted by an asterisk (*).

4. Discussion

The implantation of an endovascular device elicits a robust cellular response, particularly marked by thrombosis and inflammation following the activation of blood platelets and leukocytes. CD31 molecules expressed on cell surfaces play a pivotal role in this process, engaging in trans-homophilic interactions involving domains 1 and 2 [5]. These interactions trigger a cascade of events, including the detachment of individual cells within the blood suspension and the transmission of vital physiological signals at the cell-cell interface, particularly for the endothelium. Furthermore, upon cell activation, a cis-homophilic interaction occurs between CD31 molecules on the same cells [11], serving essential intracellular co-signaling functions [4]. Our study was designed to explore the potential of harnessing CD31 molecule interactions among endothelial cells, platelets, and leukocytes at the blood-vessel interface and their implications for biomimetic coatings on vascular stents.

CD31 surface molecules are constitutive, but they are susceptible to proteolytic shedding, triggered by cell membrane proteases upon cell activation. This process results in the loss of the trans-homophilic portion between domains 1 and 2, exposing a truncated CD31 primarily consisting of the juxtamembrane extracellular fragment [12]. To interact with CD31 on platelets and leukocytes undergoing activation, we previously investigated the potential of a synthetic peptide designed to mimic the cis-homophilic juxtamembrane sequence of CD31 (P8RI). This approach demonstrated intriguing immune-regulatory effects *in vitro* and showed promise in vascular pathologic models *in vivo*. It effectively mitigated the activation of CD31-shed leukocytes and platelets *in vitro*, and this translated into facilitated integration of CoCr and nitinol stents within the arterial wall *in vivo* [7]. However, when confronted with quiescent endothelial cells in *in vitro* experiments, the specific advantages provided by P8RI coating appeared relatively limited compared to the non-specific adhesive surfaces used to tie the peptide onto the devices, such as polydopamine or polyethylene glycol. This limitation likely arises from the concealed nature of the target sequence within the intact,

large extracellular CD31 structure, making interaction between surface-bound P8RI and the homotypic membrane-proximal sequence on endothelial CD31 molecules improbable.

The effectiveness of P8RI coating remains evident in scenarios where the interacting cells with the device are predominantly activated, as is the case in atherosclerotic arterial segments implanted with balloon-expandable stents [13]. However, the relative reduced ability of this peptide coating to interact with the homotypic segment of CD31 on resting cells, which predominantly come into contact with a flow diverter in a non-atherosclerotic artery, led us to consider utilizing the distal portion of CD31—specifically, the portion that interacts with the intact CD31 of resting cells.

Our data, collected at the two-month mark following the implantation of nitinol flow diverters in experimental saccular aneurysms, including the potential discontinuation of antiplatelet treatment immediately after implantation, holds great promise in the realm of endovascular devices for treating intracranial aneurysms. In this field, the rate of post-procedural complications, some of which can be fatal, remains unacceptably high, despite the introduction of several “biomimetic” surface coatings, such as a phosphorylcholine coating to mimic cell membrane composition, a fibrin-based nano-coating to render the device inert to the coagulation cascade, or a hydrophilic polymer coating featuring the endothelial glycocalyx [3]. Indeed, the mechanism underlying the presumed anti-thrombogenicity of these surface-modified flow diverters remains elusive. Additionally, there is a dearth of experimental *in vitro* or *in vivo* data substantiating a direct effect on inflammation and endothelialization. In fact, clinical studies conducted with SAPT have even indicated an increased risk of neointima formation and thromboembolic complications, highlighting the complexity of these challenges.

In contrast, the use of CD31 trans-homophilic peptides as a coating presents a unique approach that effectively addresses multiple aspects. By closely replicating the essential “leave me alone” support crucial for circulatory homeostasis, this approach demonstrates reduced activation of platelets and leukocytes both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, it effectively curbs neointima formation while expediting thrombus organization within the aneurysmal sac and promoting the formation of a neo-arterial wall at its entry point. This multifaceted approach holds significant promise for enhancing the safety and efficacy of endovascular devices.

Further research is warranted to gain a comprehensive understanding of the potential of CD31 trans-homophilic peptide coatings on a larger scale. This research should encompass assessments of long-term durability and exploration of clinical applications. In essence, this study marks a significant stride toward the development of more effective and biocompatible endovascular devices, with broad implications for the field of biomimetics.

5. Conclusions

Our findings suggest that the use of peptides that replicate the membrane-distal portion of CD31, which is prominently exposed on the inner side of healthy vessels, can simulate the surface of a healthy endothelium and prevent the deposition and activation of blood platelets and leukocytes that are abnormally prolonged by the presence of a foreign body at sites of endovascular stent and flow diverter implantation.

The endothelial-mimetic coating of Domain-1 used in this study can be perceived as a self-healthy surface, offering the potential to achieve rapid healing universally across all devices that come in contact with blood, such as those used for coronary, neurological, and heart valve procedures, without requiring the use of drugs to manage platelet activation or foreign-body reactions.

Further studies are necessary to investigate the efficacy and safety of CD31 domain 1 coatings on a larger scale, as well as their long-term durability and potential clinical applications. This study provides a promising step towards the development of more effective and biocompatible endovascular devices.

6. Patents

- Caligiuri, G., Nicoletti, A., Skarbek, C., Bianchi, E., and Ingenito, R. (PCT/EP2022/084241) BIOMIMETIC COATING FOR ENDOVASCULAR STENT. INSERM, University Paris Cité, University Sorbonne Paris Nord., INSERM
- Caligiuri, G., Nicoletti, A., Skarbek, C., Bureau, C., and Lefevre, I. (PCT/IB2022/000684) BIOMIMETIC COATING FOR ENDOVASCULAR STENT. AlchiMedics S.A.S., INSERM, University Paris Cité, University Sorbonne Paris Nord.

Author Contributions: Conceptualization, Jean Sénémaud, Charles Skarbek, Isabelle Lefevre, Buommino Elisabetta, Antonino Nicoletti, Christophe Bureau and Giuseppina Caligiuri; Data curation, Jean Sénémaud, Charles Skarbek and Giuseppina Caligiuri; Formal analysis, Jean Sénémaud, Charles Skarbek, Ran Song and Giuseppina Caligiuri; Funding acquisition, Giuseppina Caligiuri; Investigation, Jean Sénémaud, Charles Skarbek, Ran Song and Zhongcheng Pan; Methodology, Charles Skarbek, Ran Song, Zhongcheng Pan and Giuseppina Caligiuri; Project administration, Giuseppina Caligiuri; Resources, Belen Hernandez, Antonino Nicoletti, Christophe Bureau and Giuseppina Caligiuri; Supervision, Christophe Bureau; Validation, Isabelle Lefevre, Yves Castier, Christophe Bureau and Giuseppina Caligiuri; Visualization, Belen Hernandez, Isabelle Lefevre, Buommino Elisabetta and Antonino Nicoletti; Writing – original draft, Jean Sénémaud, Charles Skarbek and Giuseppina Caligiuri; Writing – review & editing, Belen Hernandez, Yves Castier, Christophe Bureau and Giuseppina Caligiuri.

Funding: This research was funded by the “pré-maturation” program of the University Paris Cité (StratEx, project “BEND” 2020-2022), by the RHU iVASC (ANR-16-RHUS-00010) and by a research collaborative contract between Inserm-Transfert and Alchimedics S.A.S. CS salary is supported by the French National Research Agency (ANR) as part of the future investment program integrated into France 2030, under grant agreement No. ANR-18-RHUS-0001.

Institutional Review Board Statement: All in vivo procedures described in this study were conducted by PharmaLegacy Diagnostics Co. Ltd., a biotechnology research service based in Shanghai (project #PLJC22-0005). The procedures were carried out in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the People's Republic of China. Every effort was made to minimize the suffering of the animals and to ensure their welfare throughout the study.

Data Availability Statement: All raw data from this study are available upon request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: C. Skarbek, I Lefevre, C Bureau, A. Nicoletti and G. Caligiuri are the inventors of a patent related to the work presented in this manuscript (PCT/FR2022/05223 - PCT/IB2022/000684).

References

1. Borovac JA, D'Amario D, Vergallo R, Porto I, Bisignani A, Galli M, Annibali G, Montone RA, Leone AM, Niccoli G and Crea F. Neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation: a novel clinical and therapeutic challenge. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2019;5:105-116.10.1093/ehjcvp/pvy036
2. Nakamura K and Dean LS. Long-term clinical observations for a biofunctionalized stent: Yet to deliver their theoretical benefits. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2018;91:1219-1220.10.1002/ccd.27663
3. Li YL, Roalfe A, Chu EY, Lee R and Tsang ACO. Outcome of Flow Diverters with Surface Modifications in Treatment of Cerebral Aneurysms: Systematic Review and Meta-analysis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2021;42:327-333.10.3174/ajnr.A6919
4. Caligiuri G. Mechanotransduction, immunoregulation, and metabolic functions of CD31 in cardiovascular pathophysiology. *Cardiovasc Res.* 2019;115:1425-1434.10.1093/cvr/cvz132
5. Paddock C, Zhou D, Lertkiatmongkol P, Newman PJ and Zhu J. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding. *Blood.* 2016;127:1052-61.10.1182/blood-2015-07-660092
6. Liao D, Sundlov J, Zhu J, Mei H, Hu Y, Newman DK and Newman PJ. Atomic Level Dissection of the Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) Homophilic Binding Interface: Implications for Endothelial Cell Barrier Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022;42:193- 204.10.1161/ATVBAHA.121.316668
7. Diaz-Rodriguez S, Rasser C, Mesnier J, Chevallier P, Gallet R, Choqueux C, Even G, Sayah N, Chaubet F, Nicoletti A, Ghaleb B, Feldman LJ, Mantovani D and Caligiuri G. Coronary stent CD31-mimetic coating

- favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *Eur Heart J*. 2021;42:1760-1769.10.1093/eurheartj/ehab027
8. Cortese J, Rasser C, Even G, Bardet SM, Choqueux C, Mesnier J, Perrin ML, Janot K, Caroff J, Nicoletti A, Michel JB, Spelle L, Caligiuri G and Rouchaud A. CD31 Mimetic Coating Enhances Flow Diverting Stent Integration into the Arterial Wall Promoting Aneurysm Healing. *Stroke*. 2021;52:677- 686.10.1161/STROKEAHA.120.030624
 9. Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA and Kallmes DF. 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;174:349-54.10.2214/ajr.174.2.1740349
 10. Hu M, Zhang H, Liu Q and Hao Q. Structural Basis for Human PECAM-1-Mediated Trans-homophilic Cell Adhesion. *Sci Rep*. 2016;6:38655.10.1038/srep38655
 11. Newton JP, Buckley CD, Jones EY and Simmons DL. Residues on both faces of the first immunoglobulin fold contribute to homophilic binding sites of PECAM-1/CD31. *J Biol Chem*. 1997;272:20555-63.10.1074/jbc.272.33.20555
 12. Fornasa G, Groyer E, Clement M, Dimitrov J, Compain C, Gaston AT, Varthaman A, Khallou-Laschet J, Newman DK, Graff-Dubois S, Nicoletti A and Caligiuri G. TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31. *J Immunol*. 2010;184:5485-92.10.4049/jimmunol.0902219
 13. Caligiuri G. CD31 as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2020;126:1178-1189.10.1161/CIRCRESAHA.120.315935

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.