HAL
open science

Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales

Eléonore Michel

To cite this version:

Eléonore Michel. Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales. Ingénierie biomédicale. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD086 . tel-02161930

HAL Id: tel-02161930

https://theses.hal.science/tel-02161930

Submitted on 21 Jun 2019

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.

Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales

Thèse en cotutelle
Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie

Eléonore C. Michel

Université Laval
Québec, Canada
Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie (Ph.D)

et

Université Paris XIII
Villetaneuse, France
Doctorat en science de l'ingénieur mention génie biologique et médical (Dr)

© Eléonore C. Michel, 2016

Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales

Thèse en cotutelle
Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie

Eléonore C. Michel

Sous la direction de :

Diego Mantovani, co-directeur de recherche
Didier Letourneur, co-directeur de cotutelle

Résumé

L'ingénierie des biomatériaux a connu un essor prodigieux ces dernières décennies passant de matériaux simples à des structures plus complexes, particulièrement dans le domaine cardiovasculaire. Cette évolution découle de la nécessité des biomatériaux de permettre la synergie de différentes propriétés, dépendantes de leurs fonctions, qui ne sont pas forcément toutes compatibles. Historiquement, les premiers matériaux utilisés dans la conception de dispositifs médicaux étaient ceux présentant le meilleur compromis entre les propriétés physico-chimiques, mécaniques et biologiques que nécessitait leur application. Cependant, il se peut que le dispositif possède les bonnes propriétés physico-chimiques ou mécaniques, mais que sa biocompatibilité soit insuffisante induisant ainsi des complications cliniques.

Afin d'améliorer ces propriétés biologiques tout en conservant les propriétés de volume du matériau, une solution est d'en modifier la surface. L'utilisation d'un revêtement permet alors de moduler la réponse biologique à l'interface biomatériau-hôte et de diminuer les effets indésirables. Ces revêtements sont optimisés selon deux critères principaux : la réponse biologique et la réponse mécanique. Pour la réponse biologique, les deux approches principales sont de mettre au point des revêtements proactifs qui engendrent l'adhérence, la prolifération ou la migration cellulaire, ou passifs, qui, principalement, sont inertes et empêchent l'adhérence de composés biologiques.

Des revêtements plus complexes utilisent les deux approches permettant l'adhérence spécifique de certaines cellules tout en empêchant l'adhérence d'autres composants biologiques. Cette pratique est très utile pour lutter contre la resténose, complication survenant après opération de l'athérosclérose qui obstrue les vaisseaux sanguins. Une pratique courante est la pose d'un stent qui permet d'ouvrir l'artère de nouveau et de rétablir le flux sanguin. Le phénomène de resténose obstrue de nouveau le vaisseau sanguin, majoritairement par la prolifération incontrôlée de cellules musculaires lisses. La recherche sur les revêtements contre la resténose vise à inhiber la prolifération de ces cellules tout en facilitant la ré-endothélialisation. Les revêtements permettraient alors, à la fois de favoriser l'adhérence et la prolifération de cellules endothéliales et de limiter celles des cellules musculaires lisses à la surface du stent ou en limitant toute adhérence non-spécifique.

Il a été démontré lors d'études précédentes qu'un copolymère à base de dextrane et de poly(méthacrylate de butyle) (PBMA) répondait à ces critères biologiques et qu'il possédait en plus une bonne résistance à la déformation, paramètre important lié à la déformation induite lors de l'implantation d'un stent. L'approche de ce projet était d'utiliser ce copolymère comme revêtement de stent et d'en améliorer la stabilité à long terme en formant des liens covalents avec le substrat. Pour ce faire, cela nécessitait l'activation de la partie dextrane du copolymère afin de pouvoir le greffer au substrat. Il était important de vérifier pour chaque étape l'influence des modifications effectuées sur les propriétés biologiques et mécaniques des matériaux obtenus, mais aussi d'un point de vue de la chimie, l'influence que cette modification pouvait induire sur la réaction de copolymérisation.

Dans un premier temps, le dextrane est modifié par oxydation et carboxyméthylation puis greffé à des surfaces fluorocarbonées L'analyse physico-chimique des polymères de dextrane modifiés versus leur greffage permet de choisir une voie de modification préférentielle qui n'empêchera pas ultérieurement la copolymérisation. La carboxyméthylation permet ainsi d'obtenir un meilleur recouvrement de la surface tout en conservant la structure polysaccharide du dextrane. Le greffage du dextrane carboxyméthylé (CMD) est ensuite optimisé selon différents degrés de modification, tenant compte aussi de l'influence que ces modifications peuvent induire sur les propriétés biologiques. Finalement, les CMD précédemment étudiés, avec des propriétés biologiques définies, sont copolymérisés avec des monomères de méthacrylate de butyle. Les copolymères ainsi obtenus ont été ensuite caractérisés par des analyses physico-chimiques, biologiques et mécaniques.

Ceux-ci ont présenté des propriétés mécaniques intéressantes, montrant une bonne résistance à la déformation, ainsi que des propriétés anti-adhérentes vis-à-vis des cellules. La réponse biologique obtenue avec ces copolymères n'était pas celle espérée pour l'application initiale visée, certes, mais elle ouvre la voie à des applications médicales qui nécessitent des revêtements anti-adhérents, ou encore antibactériens et antithrombogènes.

Abstract

The last decades have witnessed the remarkable growth of biomaterial science and engineering field, especially for cardiovascular applications, for which devices have evolved from simple material to complex structures. This development has stemmed from the necessity for biomaterials to exhibit different properties, related to their function, which are not always inherently compatible. Historically, the first materials selected for medical devices conception were the ones exhibiting the best compromise between all the physicochemical, mechanical and biological requirements. Nevertheless, while physicochemical and mechanical properties are often handily combined, the development of materials which also possess suitable biological properties have proved to be much more challenging, leading to clinical complications.

Surface modification represents a valid solution to improve the biological performances of medical devices while maintaining the bulk properties of the material. Biomaterial coatings may modulate the biological response at the biomaterial-host interface and decreases the undesirable effects. Coatings have been optimized in regards to two main aspects: the biological response and the mechanical response. For the biological response, the two main approaches consist in 1) inducing cell adhesion, proliferation or migration with pro-active coatings and 2) using inert material, mostly, and avoiding the adhesion of any biological components with passive coatings.

More complex coatings include the two approaches, allowing the adhesion of a specific type of cell while repelling other biological components adhesion. This method has been very useful against the restenosis phenomenon which obstructs blood vessels. A common practice is vessel stenting, a procedure that enables the reopening of the vessel and the restoration of the blood flow. Restenosis causes the new narrowing of the vessel, mostly due to uncontrolled smooth muscle cell proliferation. Researchers looked for coatings capable of limiting the restenosis occurrence by inhibiting this cell proliferation along with facilitating the re-endothelialization. Thus, the coatings would be able to improve endothelial cells adhesion and proliferation and to inhibit smooth muscle cells ones as well as avoiding non-specific adhesion.

Previous studies showed that a copolymer made of dextran and poly(butyl methacrylate) (PBMA) demonstrated such biological properties and a good resistance to deformation, which is an important parameter related to the deformation implied in a stent implantation. In this work, the approach was to use this copolymer as a stent coating and to increase its long-term stability by providing covalent bonds with the substrate. To do so, the dextran part of the copolymer firstly needed to be activated in order to be grafted to the surface. Thus, it was important to ascertain the influence of the multiple modifications on the biological and mechanical properties of the resulting materials at each step, but also towards a chemical point of view, the influence that these modifications may have on the subsequent copolymerization.

First, dextran was modified by oxidation (OxD) and carboxymethylation (CMD) reactions and grafted to fluorocarbon surfaces. Physicochemical analyses were used to validate a way of dextran modification which

allowed the grafting without hindering the subsequent copolymerization. The modification by carboxymethylation was selected and CMD grafting was subsequently optimized to study the influence of the modification degree upon the biological response. The resulting copolymers were then characterized by physicochemical, biological and mechanical analyses.

They presented interesting mechanical properties, exhibiting a good resistance to deformation, as well as cell antiadhesive properties. The biological response obtained with the copolymers was not as expected for the application aimed, but pave the way to medical applications requiring antiadhesive coatings, or antibacterial and antithrombogenic coatings.

Table des matières

Résumé iii
Abstract v
Liste des figures x
Liste des tableaux xiii
Abréviations et anglicisme xiv
Remerciements xvi
Avant-propos xvii
1. Introduction 1
1.1. Les maladies cardiovasculaires et leurs traitements 1
1.1.1. Le système cardiovasculaire 1
1.1.2. Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose 3
1.1.3. Les traitements de l'athérosclérose 5
1.1.4. Les dispositifs médicaux liés aux maladies cardiovasculaires 6
1.2. Les complications cliniques et leurs solutions : les revêtements de surface 9
1.2.1. Les complications cliniques 9
1.2.2. L'adhérence cellulaire 13
1.2.3. Les revêtements pour moduler la réponse biologique 15
2. Le projet : Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales 19
2.1. Les substrats 19
2.1.1. L'acier inoxydable 316 L 20
2.1.2. Les surfaces fluorocarbonées 20
2.1.3. L'amination par plasma 21
2.2. Les polymères et leurs synthèses 22
2.2.1. Les polysaccharides 23
2.2.2. Les polyacrylates 26
2.2.3. Les copolymères polysaccharides-polyacrylates 26
2.2.3.1. Les associations polysaccharides-acrylates 26
2.2.3.2. Les voies de copolymérisation 28
2.3. Caractérisation des matériaux et leurs propriétés 29
2.3.1. Les polymères et les surfaces de polymères 29
2.3.2. Résistance mécanique des polymères 31
2.3.3. Performances biologiques 32
2.4. Stratégie et structure de la thèse 33
3. Polysaccharides grafting on fluorocarbon films deposited by plasma on 316L stainless steel for long term stable stent 37
3.1. Résumé 38
3.2. Abstract 39
3.3. Introduction 40
3.4. Materials and Methods 41
3.4.1. Materials and sample preparations 41
3.4.2. Dextran activation 42
3.4.3. Surface immobilization 42
3.4.4. Modification characterization 43
3.5. Results and discussion 43
3.5.1. Polymer characterization 43
3.5.2. Grafting characterization 44
3.6. Conclusions 46
3.7. Acknowledgments 47
4. Dextran grafting on PTFE surface for cardiovascular applications 48
4.1. Résumé 49
4.2. Abstract 50
4.3. Introduction 51

4.4. Materials and Methods ... 52
4.4.1. Dextran modification ... 52
4.4.2. Surface modification ... 52
4.4.3. Surface characterization ... 53
4.4.4. Hemocompatibility ... 53
4.4.5. Cell culture ... 54
4.5. Results and discussion ... 55
4.5.1. Carboxymethyldextran synthesis ... 55
4.5.2. CMD immobilization on aminated PTFE surface ... 57
4.5.3. Biological behavior ... 60
4.6. Conclusions ... 64
4.7. Acknowledgments ... 65
5. Carboxymethyl dextran and butyl methacrylate graft copolymers as non-adherent biomaterials 66
5.1. Résumé ... 67
5.2. Abstract ... 68
5.3. Introduction ... 69
5.4. Materials and Methods ... 70
5.4.1. Materials ... 70
5.4.2. Graft copolymerization ... 70
5.4.3. Extraction of homopolymer and mass balance determination ... 71
5.4.4. Side chain separation ... 71
5.4.5. Fabrication of films ... 71
5.4.6. Characterizations ... 72
5.4.6.1. Solid state nuclear magnetic resonance (^{13}C-NMR) ... 72
5.4.6.2. Attenuated total reflectance Fourier-transform infra-red (FTIR) ... 72
5.4.6.3. Molecular mass determination (HPSEC) ... 73
5.4.6.4. Static contact angle (CA) ... 73
5.4.6.5. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) ... 73
5.4.7. Mechanical characterization ... 74
5.4.8. Biological assay ... 74
5.4.8.1. Samples preparations ... 74
5.4.8.2. Cell culture ... 75
5.4.8.3. Cytoxicity ... 76
5.4.8.4. Cell adhesion and proliferation ... 76
5.5. Results and discussion ... 77
5.5.1. Copolymer and synthesis characterization ... 77
5.5.2. Reaction scheme ... 79
5.5.3. Solubility and films of copolymers ... 81
5.5.4. Mechanical properties ... 83
5.5.5. Biological performances ... 84
5.6. Conclusions ... 88
5.7. Acknowledgments ... 89
6. Discussion générale ... 90
6.1. Le greffage du dextrane ... 90
6.1.1. La modification du dextrane : un compromis entre greffage et copolymérisation ... 90
6.1.2. Optimisation du greffage du CMD en milieu aqueux ... 92
6.2. La conception de techniques de purification des polymères CMD et CMD-PBMA ... 93
6.2.1. La précipitation dans un non-solvant ... 93
6.2.2. La purification du CMD ... 94
6.2.3. L'importance de la mise en forme du CMD-PBMA pour sa purification ... 95
6.3. La méthodologie développée et les défis relevés pour la caractérisation des copolymères ... 96
6.3.1. Les techniques de caractérisation ... 97
6.3.2. Méthodologie de la détermination du schéma réactionnel ... 98
6.4. Limites et perspectives : de la synthèse à l'application ... 101
6.4.1. Mieux comprendre la structure et la composition du copolymère CMD-PBMA ... 101
6.4.2. Le greffage du copolymère : les approches ... 102

6.4.3. La conception de revêtements pour moduler les propriétés biologiques 102
7. Conclusions..... 106
8. Annexe 107
8.1. Le greffage du CMD par EDC/NHS 107
8.2. La purification du CMD..... 109
8.3. La purification du CMD-PBMA 111
8.4. Adhérence des cellules musculaires lisses et endothéliales en co-culture..... 113
8.5. Autres tests préliminaires d'adhérence sur les films de CMD-PBMA..... 116
9. Références..... 117

Liste des figures

Figure 1 : Le système circulatoire sanguin.[1] 1
Figure 2 : Structure d'une artère.[2] 2
Figure 3 : Artère atteinte d'athérosclérose. Adaptée de « Atherosclerosis. Encyclopædia Britannica, Inc. ».[5] 4
Figure 4 : Traitements mécaniques de l'athérosclérose. a) artère saine, b) artère sténosée, c) athérectomie rotationnelle, d) angioplastie par ballonnet, e) angioplastie avec pose de stent. Adaptée de ©Healthwise, Incorporated.[13] 6
Figure 5 : Réponse inflammatoire à un corps étranger. A l'implantation du matériau se forme une couche de protéines adsorbées à la surface qui va mener au recrutement de phagocytes et de fibroblastes qui vont produire une matrice de collagène qui évolue jusqu'à l'encapsulation de l'implant par une matrice fibreuse.[30] 10
Figure 6 : Formation d'un biofilm en 3 étapes. 1) attachement des bactéries à la surface. 2) croissance et maturation du biofilm. 3) détachement des bactéries pour une nouvelle colonisation.[32] 11
Figure 7 : Phases de l'hyperplasie néotintimale. a) lésion aigüe. b) phase de thrombose. c) phase de migration. d) phase de prolifération. e) néointima mature. LEE – limitante élastique externe, LEI – limitante élastique interne, CML – cellules musculaires lisses. Adaptée de Schwatz et al.[32] 12
Figure 8 : Structures chimiques du CF_x[76] et du PTFE. 21
Figure 9 : Fonctionnalisation par plasma de surfaces fluorocarbonées, introduisant à la surface des amines primaires ainsi que d'autres espèces.[84] 22
Figure 10 : Exemple de modifications possibles du dextrane permettant d'obtenir de nouveaux matériaux de par leurs propriétés et leurs mises en forme. L'introduction de groupements chimiques (COOH, HCO, etc.) sur la chaîne de dextrane permet d'obtenir des hydrogels[105] après réticulation, de le greffer à d'autres polymères, d'améliorer ses propriétés en solution[106] ou encore de recouvrir des surfaces via des liens covalents ou ioniques.[52,107] Le dextrane natif peut aussi directement être modifié avec d'autres polymères, aboutissant sur d'autres types d'hydrogels[108–110] et de revêtements. Le plus souvent, il s'agit de revêtements composés de plusieurs couches de différents polymères liés entre eux par des liens ioniques ou covalents. Dans les deux cas, les revêtements peuvent par la suite être couplés à des biomolécules[111–114] ou d'autres polymères, afin de moduler les propriétés biologiques. 24
Figure 11 : Structures du dextrane et de ses dérivés carboxyméthylés (CMD), et oxydés (OxD). La structure représente une unité de CMD monosubstituée (un seul CM). Lors des synthèses de CMD et OxD toutes les unités saccharidiques ne sont pas forcément modifiées. 25
Figure 12 : Structures du groupement acrylate et du poly(méthacrylate de butyle) (PBMA). 26
Figure 13 : Les polymères doivent montrer une certaine souplesse et résister à la déformation. a) Souplesse du cathéter Ryujin™[136] b) Délaminage du revêtement de PEVA/PBMA du stent CYPHER®[137] c) Flexibilité de la prothèse HEMAGUARD.[23] 31
Figure 14 : Essai de traction et de relaxation sur éprouvette de copolymère CMD-PBMA. a) appareil de traction b) rupture c) relaxation des contraintes en fonction du temps (c.2) pour une déformation constante (c.1). 32
Figure 15 : Méthodologie générale du projet. Parties non-accomplies en pointillés. 34
Figure 16 : Partie 1. Choix de la modification du dextrane dans l'idée du greffage ultérieur du copolymère. 35
Figure 17 : Partie 2. Optimisation du greffage du dextrane carboxyméthylé (CMD) et réponse biologique des revêtements. 35
Figure 18 : Partie 3. Synthèse du copolymère de carboxyméthyldextrane (CMD) et poly(méthacrylate de butyle) (PBMA) et comportement mécanique et biologique de films de copolymères. 36
Figure 19 : Covalent grafting of carboxymethylated dextran (CMD) and periodate oxidized dextran (OxD) on aminated PTFE or aminated CF_x-SS316L. 41
Figure 20: Characterization of modified dextran a) ATR-FTIR spectra and b) correlation between the peak's area of the carbonyl vibration with the degree of modification. 44
Figure 21 : HR C1s spectra of a) PTFE-NH_2, b) PTFE OxD 20% c) CMD 50% 45

Figure 22 : HR C1s spectra of the different modification steps from CF_x film until activated dextran graftings, with the following bonds: CF_3-CF_3 (282.8 eV), CF-CF (290.3 eV), NC=O/HOC=O (288.2 eV), C-N/C-H (286.5 eV) and C-C/C-H (285.0 eV). 46
Figure 23: ^{1}H-NMR spectra of: a) dextran T70 ; b) CMD 0.2 ; c) CMD 0.4 ; d) CMD 1. H1 peak represents the anomeric proton, H2-H6 (dash line) are the remaining protons of the anhydroglycopyranoside unit of dextran. H1' is the anomeric proton when the position 2 is substituted. a (plain line) peaks represent the protons of carboxymethyl groups. 56
Figure 24: Contact angle measurements with water on bare PTFE and modified with CMDs. PTFE: 120,9°±3,7° ; CMD 0.2: 37,1°±4,2° ; CMD 0.4: 32,7°±5,0° ; CMD1.3: 41,2°±9,7°. n > 5. 58
Figure 25: Relative percentage from XPS high resolution on C1s with the following bonds: CF2 (291.5eV) ; NC=O/HOC=O (288.5eV) ; C-N/C-O (286.5eV) and C-C/C-H (285.0eV). n = 3 59
Figure 26: Clotting time evaluation by free-hemoglobin absorbance measurement. * indicates the values significantly different from PTFE for each time determined by ANOVA one-way p<0.05. 61
Figure 27: HUVEC and HUASMC adhesion on CMD grafted PTFE surface and bare PTFE. * and ** indicates the values significantly different respectively from PTFE and all other samples, determined by one way ANOVA p<0.05. 62
Figure 28: Adhesion tests with endothelial cells. a) uncoated PTFE ; b) CMD 0.2 ; c) CMD 0.4 ; d) CMD 1.3. 63
Figure 29: Suggested CMD 0.2 and CMD 1.3 coatings topography depending on the environment. 64
Figure 30: A typical stress curve versus time obtained with CMD-PBMA sample. 74
Figure 31: FTIR spectra of homopolymer of PBMA (red) and of the 4 copolymers synthesized: CMD-PBMA 1 (olive), CMD-PBMA 2 (green), CMD-PBMA 3 (purple) and CMD-PBMA 4 (blue). Spectra were normalized to the characteristic band of C=O vibration from acrylate at 1724 cm^{-1}. 78
Figure 32: Solid state ^{13}C-NMR spectra of CMD and CMD-PBMA copolymer. CMD spectrum is representative of both CMD 0.2 and CMD 0.4. CMD-PBMA spectrum is representative of the four copolymers CMD-PBMA 1, 2, 3 and 4 (Table 18). 79
Figure 33: Suggested reaction scheme for CMD-PBMA copolymerization. Reaction between CMD chains and ceric ions (a) creates radicals on CMD chains in 3 different sites (hydroxyl, glycol, hemiacetal) and free radicals in solution (b). Radicals react with BMA monomers to produce macroradicals of growing homopolymer chains (c) and their recombination end forming majorly copolymer CMD-PBMA and homopolymer of PBMA (d). 80
Figure 34: Cytotoxicity assay by resazurin absorbance after 1 and 7 days of extraction medium. Cell viability after 24 h of culture expressed as a percentage of the viability of cells in the control: cells cultivated with extracted medium from glass cover-slip immersion. The dashed line shows 80% cell viability (viability > 80%: no cytotoxicity). 85
Figure 35: HUVEC after 1, 4 and 7 days of culture (D1, D4 and D7) on polymeric surfaces. Cell adhesion expressed as a percentage of cells versus the control on glass. 86
Figure 36: 3T3 fibroblasts presence after 1, 4 and 7 days of culture (D1, D4 and D7) on polymeric surfaces. Cell adhesion expressed as a percentage of cells versus the control on glass. 87
Figure 37: Fluorescent micrographs of HUVEC (left panel) and 3T3 cells (right panel) after 4 days of culture. From top: Representative micrographs of Glass, both PBMA and Silicone (Sil.) and CMD-PBMA 3 and 4 (CMD-PBMA). Bottom: HUVEC islets at day 1 and fibroblast clusters on polymeric surfaces. Nuclei are stained with DAPI (blue) and cell cytoskeleton (actin filaments) with rhodamine-phalloïdine (red). Magnification x 20. 88
Figure 38 : Méthodologie de purification du CMD. 94
Figure 39 : Efficacité de l'action de EDC et NHS en fonction du pH.[154,198,199] 107
Figure 40 : Greffage du CMD aux surfaces aminées avec EDC et NHS. a) structures d'EDC et NHS. b) couplage de EDC avec CMD pour former un ester instable, le O-acylisourea. c) couplage avec NHS pour former un ester-NHS plus stable qui va réagir avec les amines de la surface pour former un lien amide. $R_1 = C_2H_5$; $R_2 = (C_2H_6)$-$N(CH_3)_2$; $R_3 = CH_2$-CMD. 108
Figure 41 : Formation de produits secondaires lors du greffage du CMD avec EDC/NHS. EDC et NHS peuvent réagir entre eux pour former des composés secondaires (a et b)[198,199] et l'ester instable O-acylisourea, formé après coulage du CMD avec EDC, peut réarranger ses liaisons et former un amide et de l'isocyanate (c).[154] 109

Figure 42 : Spectre RMN-^{1}H du CMD 0.2 à chaque étape de purification avec disparition des pics d'acides. a) après la première précipitation, rinçage à l'éther diéthylique et séchage sous vide, b) après la première re-dissolution, c) après la seconde re-dissolution. 110
Figure 43 : Spectre RMN-^{1}H du CMD 1.3 après 2 étapes de dissolution/précipitation à température ambiante. Les pics du méthanol et d'éther diéthylique sont observés à 3,30 ppm et 1,15-1,12 ppm, respectivement. 111
Figure 44 : Formules chimiques des contaminants du CMD. 111
Figure 45 : Les étapes de purification du copolymère CMD-PBMA. a) copolymère sous forme de gel décanté après précipitation dans l'éthanol, b) lavage à l'EDTA avant et après centrifugation, c) extraction au Soxhlet par vapeur d'acétone (ligne rouge) et condensation solubilisant l'homopolymère de PBMA (ligne bleue), d) précipitation du copolymère dans acétone/eau après extraction au Soxhlet. 113
Figure 46 : Méthode de culture cellulaire avec insert avec co-culture de HUVEC et HUASMC. Comme contrôles, deux monocultures de HUVEC (EC) et de HUASMC (SMC) sont faites. 114
Figure 47 : Adhérence et prolifération des HUVECs et HUASMCs en co-culture. Les microscopies présentées pour le CMD-PBMA sont représentatives pour les deux copolymères CMD-PBMA 3 et 4 et pour toutes les cultures (EC/EC, SMC/SMC, EC/SMC). Les images sans échelle représentent une image de 450,6 µm de longueur, les barres d'échelles représentent 50 µm. 115

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cahier des charges et matériaux pour la confection de dispositifs médicaux. 8
Tableau 2 : Les facteurs influençant l'adhérence cellulaires. 14
Tableau 3 : Résumé des complications cliniques et de leurs manifestations biologiques principales, ainsi que des dispositifs principaux concernés par chaque complication et des stratégies envisagées pour y remédier. 15
Tableau 4 : Résumé des principaux revêtements présents dans la littérature. 16
Tableau 5 : Méthodes de recouvrement de surfaces. 18
Tableau 6 : Composition massique de l'acier inoxydable 316L.[70,71] 20
Tableau 7 : Propriétés mécaniques de l'acier inoxydable 316L.[70,71] 20
Tableau 8 : Quelques exemples de propriétés biologiques du dextrane et de certains de ses dérivés (oxydé, carboxyméthylé, sulfaté). 23
Tableau 9 : Exemple d'association entre les polysaccharides et les acrylates/polyacrylates et leur application. 27
Tableau 10 : Propriétés apportées par le polyacrylate et le polysaccharide au sein du copolymère et leur intérêt versus les applications possibles. 27
Tableau 11 : Techniques de caractérisation.[135] 30
Tableau 12 : Analyses des performances biologiques in vitro[138–140] 33
Table 13 : Concentration of modified dextran solutions and catalysts for aminated PTFE graftings. ... 42
Table 14 : XPS survey results at different steps of PTFE surface modifications* 44
Table 15: XPS survey results at different steps of 316L surface modifications 45
Table 16: Degree of substitution assessed by ^{1}H-NMR and acid-base titration method. Dx/MCA is the molar ratio of dextran on monochloroacetic acid used for each synthesis. 57
Table 17: Surface chemical composition obtained from XPS survey spectra for PTFE before and after plasma treatment and CMDs grafting. 58
Table 18: Mass balance of the graft copolymerization synthesis in terms of yield and homopolymer content for the 4 initial conditions used. 77
Table 19: Behavior of the copolymers in various solvents. 82
Table 20: XPS characterizations and contact angles of CMD-PBMA films and PBMA coating. 83
Table 21: Linear modulus (E_L) and elongation to rupture (e_r) of CMD-PBMA films determined from stress-relaxation assays. Stress-relaxation assays were successively performed at a constant deformation of 3% until 27% of total deformation and then constant traction was applied until rupture (10 mm.min^{-1}), at room temperature. e_r is defined as the ratio between changed in length and initial length. Mechanical assays were performed on dumbbell-shaped films with a rectangular section of 20x9x0.09-0.12 mm. Results are the means of at least 3 assays. 84
Tableau 22: Comparaison des résultats entre les synthèses faites à partir de CMD et celles faites à partir de CMDOH où l'hémiacétal terminal a été réduit. 100
Tableau 23 : Exemple de greffage dans un mélange de solvants. 102
Tableau 24 : Réponse biologique de revêtements de PBMA et de copolymères Dextrane-PBMA dans la littérature et dans ce travail. 104

Abréviations et anglicisme

AFM	:	Atomic Force Microscopy – Microscopie à Force Atomique
ATR-FTIR	:	Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy Réflectance Totale Atténuée – Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
BMA	:	Butyl Methacrylate – Méthacrylate de Butyle
CA	:	Contact Angle – Angle de Contact
CF_x	:	Polymère de fluorocarbone (simili-PTFE)
CMD	:	Carboxyméthyldextrane
CMD-PBMA	:	Carboxyméthyldextrane-co-poly(méthacrylate de butyle)
CML	:	Cellule Musculaire Lisse
DES	:	Drug eluting stent – Stent à élution médicamenteuse
DS	:	Degré de Substitution
Dx	:	Dextrane
EC	:	Endothelial cells – Cellules endothéliales
EDC	:	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétra-acétique
HUVEC	:	Human Umbilical Vein Endothelial Cells – Cellules endothéliales du cordon ombilical humain
MCA	:	Monochloroacetic acid – Acide monochloroacétique
NHS	:	N-hydroxysuccinimide
NMR/RMN	:	Nuclear Magnetic Resonance – Résonance Magnétique Nucléaire
OxD	:	Dextrane oxydé
PA	:	Principe Actif
PBMA	:	Poly(méthacrylate de butyle)
PTFE	:	Polytétrafluoroéthylène
SEC/CES	:	Steric exclusion chromatography – Chromatographie d'exclusion stérique
THF	:	Tétrahydrofurane
XPS	:	X-ray photoelectron spectroscopy – Spectroscopie photoélétronique des rayons X

« C’est la dernière ligne droite »

Catherine Michel, 2006

A ma mère, qui *a toujours eu beaucoup d’humour*

Remerciements

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse a été effectué dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université Laval (Québec, Canada) et l'Université Paris XIII (Villetaneuse, France). Le projet s'articule principalement autour de l'utilisation du dextrane en tant que revêtements pour des applications vasculaires utilisant différentes techniques de recouvrement. Pour ce faire, il met en jeu la synthèse de dérivés du dextrane ainsi que la synthèse de copolymères à base de ces dérivés.

Afin de mener à bien la synthèse, la fabrication des revêtements ainsi que la caractérisation physico-chimique et biologique des matériaux utilisés dans ce projet, les deux laboratoires ont amené leurs expertises respectives :

- Le **Laboratoire de Biomatériaux et Bioingénierie** (LBB) à l'Université Laval, a développé depuis plusieurs années des techniques de caractérisation de surfaces approfondies autour de la problématique des revêtements de stents. En effet, les travaux du laboratoire ont, entre autres, permis de développer un revêtement de stent à base de polymère fluorocarboné déposé par plasma. Ce substrat de base a permis le développement de plusieurs projets de recherche en matière de revêtements et de techniques de caractérisation physico-chimiques mais aussi biologiques et mécaniques. Parmi ces techniques se trouvent la spectroscopie photoélectronique des rayons X, la microscopie électronique à balayage, l'angle de contact en statique, la culture cellulaire et bactérienne in vitro, ou encore les tests de traction.
- Le **Laboratoire de Recherche Vasculaire Translationnelle** à l'Université Paris XIII (LVTS, Inserm U1148), anciennement connu sous le nom du laboratoire de Bio-ingénierie des Polymères Cardiovasculaires (jusque fin 2013), a porté une importante partie de sa recherche sur le développement de biomatériaux à base de polymères naturels : les polysaccharides. Ces biomatériaux utilisent les polysaccharides dans le domaine l'ingénierie tissulaire sous forme d'échafaudage, d'imagerie médicale ou encore de revêtements de stent. Pour ce faire, le laboratoire a développé son expertise aussi bien dans la chimie des polymères que dans la validation in vivo et in vitro des biomatériaux, utilisant des techniques d'analyse comme la résonance magnétique nucléaire, la chromatographie d'exclusion stérique ou encore la spectroscopie infrarouge.

De ce fait, les expertises complémentaires des deux laboratoires ont permis la réalisation de ce projet multidisciplinaire.

Le premier chapitre de cette thèse présente le contexte général dans lequel s'inscrit ce travail et les problématiques qui lui sont associées. Le chapitre 2 fait l'état de la littérature liée au projet lui-même et de la méthodologie utilisée. Les chapitres 3, 4 et 5 présentent les résultats obtenus ainsi que leur discussion, et font l'objet de 3 articles scientifiques.

Chapitre 3 : Polysaccharides grafting on fluorocarbon films deposited by plasma on 316L stainless steel for long term stable stent.

Le premier article a pour but d'étudier la synthèse de dérivés du dextrane et leur greffage sur des surfaces fluorocarbonées selon différentes modifications.

Auteurs : Eléonore C. Michel, Pascale Chevallier, Amélie Barrère, Didier Letourneur et Diego Mantovani

Journal : Advanced Materials Research 409 (2011) 164-169, soumis en Mars 2011 publié en Novembre 2011

Le premier article fait l'objet d'un compte rendu de conférence qui permet de présenter des résultats approfondis ainsi que préliminaires. Pour cet article, j'ai effectué toutes les expériences ainsi que la rédaction et la mise en forme. Pascale Chevallier m'a conseillé sur la structure et le contenu. Amélie Barrère m'a guidé sur les expériences effectuées. Les autres auteurs y ont apporté leurs corrections.

Note *: des changements mineurs ont été apportés à ce chapitre par rapport à l'article* publié par souci *d'*uniformité du manuscrit.

Chapitre 4 : Dextran grafting on PTFE surface for cardiovascular applications

Dans ce second article, la synthèse de dextrane carboxyméthylés (CMD) a été effectuée et les polymères ont été caractérisés. Le greffage du CMD a été optimisé sur des surfaces aminées de PTFE. L'hécompatibilité et l'adhérence cellulaire des surfaces produites ont été étudiées.

Auteurs : Eléonore C. Michel, Vanessa Montaño-Machado, Pascale Chevallier, Amélie Labbé-Barrère, Didier Letourneur et Diego Mantovani

Journal : Biomatter 4 (2014) e28805, soumis en Janvier 2014, accepté en Mai 2014, publié en Avril 2014

Le greffage des surfaces et la caractérisation ont été effectués par Pascale Chevallier et moi-même. Vanessa Montaño-Machado a conçu et effectué les tests biologiques. J'ai effectué l'entière rédaction (texte, figures et tableaux) qui a été corrigée par les auteurs. Pascale Chevallier et Vanessa Montaño-Machado m'ont conseillé pour la structure et le contenu.

Chapitre 5 : Dextran and poly(butyl methacrylate) graft copolymers as non-adherent materials for vascular applications

Auteurs : Eléonore C. Michel, Pascale Chevallier, Caroline Loy, Lucie Lévesque, Didier Letourneur et Diego Mantovani

Journal : Cet article doit être soumis à Macromolecular Bioscience

Pour cet article, tous les auteurs ont participé au choix et à la conception des expériences. J'ai effectué toutes les expériences de synthèses, de caractérisation et les tests mécaniques. Caroline Loy et Lucie Lévesque m'ont

aidé à concevoir, réaliser et analyser les essais biologiques. J'ai effectué l'entière rédaction (texte, figures et tableaux) qui a été corrigée et améliorée par les autres auteurs.

Après les résultats, le **chapitre 6** présente une discussion générale sur le travail effectué, mettant en relief la démarche utilisée, les défis rencontrés, ainsi que les perspectives. Les conclusions générales du projet sont présentées dans le **chapitre 7**. Le **chapitre 8** contient des annexes présentant les résultats de travaux non publiés.

Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales

1. Introduction

1.1. Les maladies cardiovasculaires et leurs traitements

1.1.1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang, qui permettent la distribution de l'oxygène et des nutriments à tous les organes (Figure 1). Le cœur est un organe creux et musculaire qui assure la circulation sanguine par des contractions rythmiques. Ainsi, le sang oxygéné est distribué depuis le ventricule gauche du cœur vers tous les organes du corps par l'intermédiaire des artères systémiques puis, suite à l'échange gazeux, le sang désoxygéné est ramené dans l'oreillette droite par les veines systémiques : il s'agit de la circulation systémique. La circulation pulmonaire, quant à elle, a pour fonction de réoxygéner le sang veineux arrivant de l'artère pulmonaire par le biais des alvéoles pulmonaires, puis de renvoyer le sang oxygéné au cœur par la veine pulmonaire.

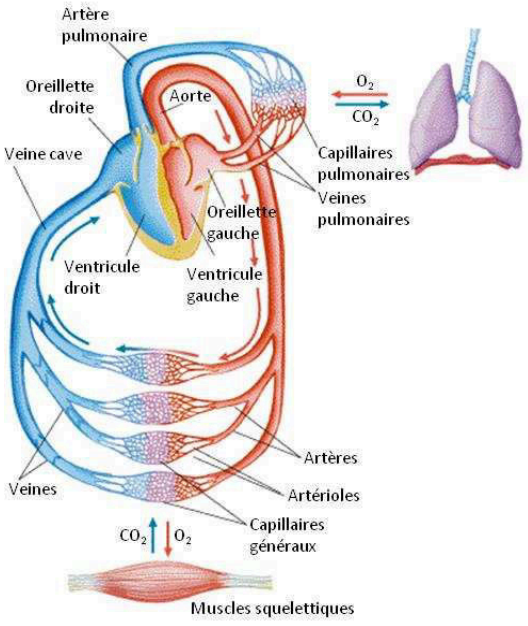


Figure 1 : Le système circulatoire sanguin.[1]

Les artères

Les artères, les veines et les capillaires constituent les trois types de vaisseaux sanguins. Dans le corps humain, on estime qu'ils s'étendent sur une longueur totale d'environ 100 000 km. Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins mesurant de 5 à 10 µm de diamètre et forment des réseaux ramifiés à travers lesquels les échanges de substances chimiques entre le sang et les cellules se font. Ces réseaux de capillaires sont reliés, d'une part, aux veines qui possèdent des valvules imposant le sens de la circulation au sang, et d'autre part, aux artères. Les artères sont constituées de trois tuniques (Figure 2) :

- **L'adventice** : est la couche externe de l'artère permettant son ancrage aux tissus environnants. Elle est composée de tissus conjonctifs qui contiennent des cellules, des fibres de collagènes et quelques fibres élastiques qui permettent à l'artère de s'étirer sans subir de dilatation excessive. Parmi les cellules du tissu conjonctif se trouvent les fibroblastes dont la fonction principale est la synthèse de matrice extracellulaire et de collagène et qui tiennent un rôle détermination dans le processus de cicatrisation.
- **La media** : est comprise entre les membranes limitantes élastiques interne et externe. Elle est majoritairement constituée de cellules musculaires lisses et de constituants extracellulaires comme l'élastine, le collagène et des protéoglycanes. Les cellules musculaires lisses sont orientées dans la direction circonférentielle de l'artère et assurent la vasomotricité du vaisseau en se contrant ou en se relaxant en fonction du débit sanguin.
- **L'intima** : est la tunique interne de l'artère et est constituée d'une fine couche de tissu conjonctif et de l'endothélium. L'endothélium est une monocouche de cellules endothéliales orientées dans le sens du flux sanguin. Ces cellules sont en contact direct avec le sang et permettent l'échange de constituants avec les tissus environnants. Elles ont la possibilité de migrer et de proliférer sur le site d'une lésion lorsque l'endothélium est endommagé.

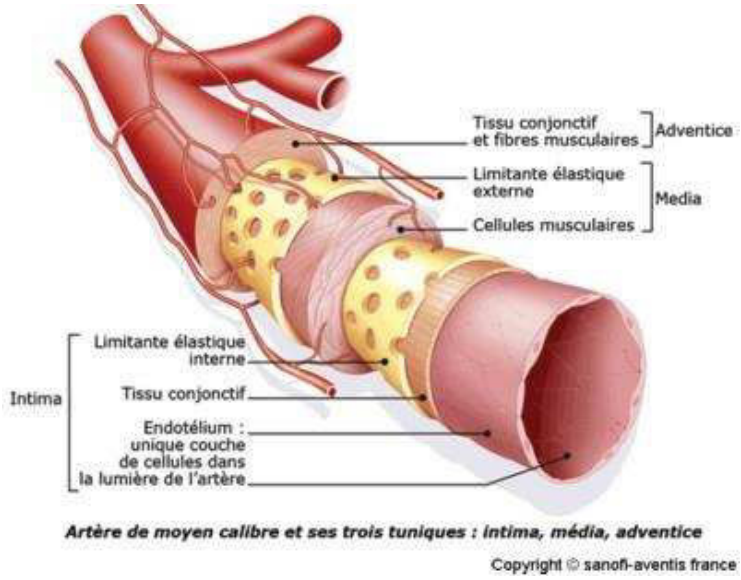


Figure 2 : Structure d'une artère.[2]

Le sang

Le sang appartient au groupe des tissus conjonctifs contenant plusieurs types de cellules en suspension dans un fluide aqueux appelé plasma. Le corps humain moyen contient de 4 à 6 L de sang. Trois types de cellules sont en suspension dans le plasma sanguin :

- Les globules rouges (érythrocytes) : qui transportent l'oxygène (O_2).
- Les globules blancs (leucocytes) : qui constituent un des moyens de défense de l'organisme.
- Les plaquettes (thrombocytes) : qui jouent un rôle principal dans la coagulation sanguine.

Il constitue un milieu agressif pour tout matériau étranger, dû à la présence d'ions chlorure et de gaz dissous. En plus de la contrainte chimique, les pulsations du flux sanguin imposent une contrainte mécanique.

1.1.2. Les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont une des principales causes de décès au monde en représentant 17,5 millions de décès par an, soit 31 % de la mortalité mondiale.[3] En France, elles représentaient 27 % et au Canada 28 % des décès totaux en 2014.[4] Ces maladies constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, comprenant :

- les cardiopathies coronariennes (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le muscle cardiaque),
- les maladies cérébro-vasculaires (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau),
- les artériopathies périphériques (touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent les bras et les jambes),
- les cardiopathies rhumatismales (affectant le muscle et les valves cardiaques),
- les malformations cardiaques congénitales (malformations de la structure du cœur déjà présentes à la naissance),
- les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (obstruction des veines des jambes par un caillot sanguin, susceptible de se libérer et de migrer vers le cœur et les poumons).

D'une manière générale, ces troubles sont à l'origine d'occlusions artérielles, empêchant le sang de circuler et menant à des infarctus ou accidents vasculaires cérébraux (AVC). Il existe également d'autres symptômes moins aigus comme des essoufflements, des arythmies cardiaques ou encore des syncopes. D'ici 2030, le nombre de décès dus aux maladies cardiovasculaires est estimé à 23,6 millions, principalement des suites de cardiopathies et accidents vasculaires cérébraux.[3] L'augmentation des facteurs de risques (tabagisme, le manque d'activité physique, l'hypertension, obésité, diabète, taux élevé de cholestérol, etc.) ou encore des facteurs génétiques soutient cette tendance.

L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire touchant les artères (aorte abdominale, coronaires, artères cérébrales, artères des jambes) par l'épaississement de la paroi artérielle et l'occlusion partielle ou totale (sténose) de la lumière du vaisseau. Les plus petites artères, comme les coronaires, s'obstruent d'autant plus facilement. Cette obstruction va entraîner une baisse de l'apport sanguin aux organes (ischémie) empêchant leur bonne alimentation en oxygène (hypoxie) et en nutriments, entraînant donc le dysfonctionnement, voir l'arrêt de ces organes. Ce phénomène vient souvent s'ajouter au vieillissement naturel des vaisseaux, qui entraîne la rigidité des parois artérielles (artériosclérose).

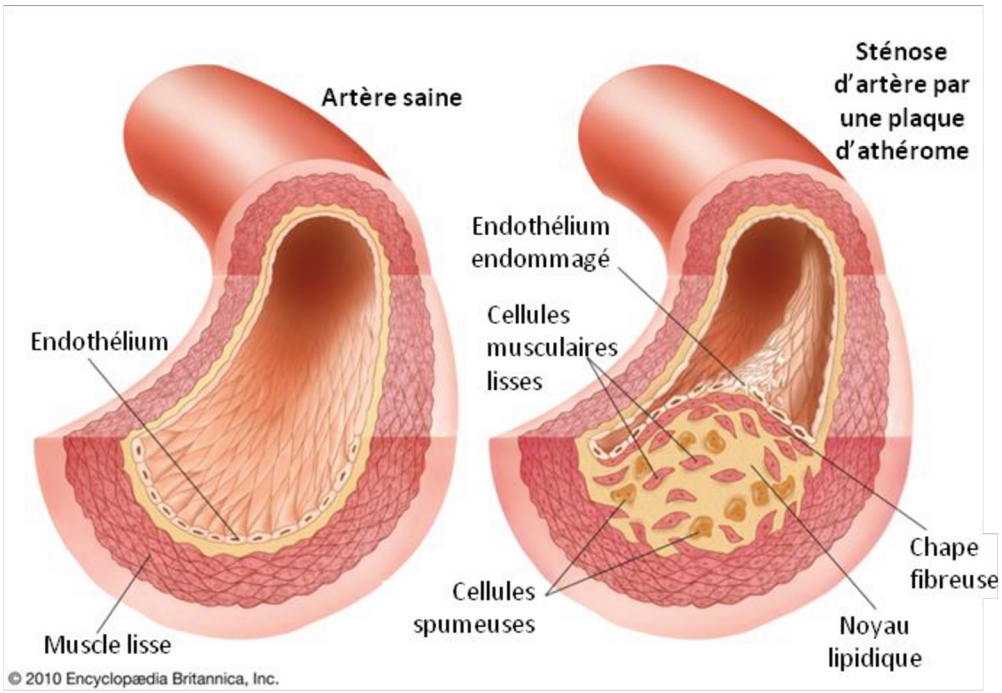


Figure 3 : Artère atteinte d'athérosclérose. Adaptée de « Atherosclerosis. Encyclopædia Britannica, Inc. ».[5]

L'occlusion de l'artère est provoquée par l'accumulation de lipoprotéines (cholestérol LDL) dans l'intima, qui va évoluer jusqu'à former un noyau lipidique. Le noyau est constitué de lipides, de débris cellulaires, de calcium et de cellules spumeuses qui sont des cellules (macrophages) gorgées de cholestérol. Il est isolé de la lumière artérielle par une chape fibreuse principalement constituée de matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses. Cet ensemble forme la plaque d'athérome (Figure 3).[6] Cette plaque peut-être plus ou moins stable et subie des contraintes dues au flux sanguin. Ces contraintes peuvent rompre la chape fibreuse qui va ainsi laisser le matériel thrombogène, contenu dans le noyau lipidique, être au contact du sang. Cela entraîne un processus de coagulation menant à la formation d'un thrombus (caillot) qui participera fortement à l'obstruction de l'artère.[7] L'état de la plaque d'athérome permet d'évaluer la sévérité de l'athérosclérose (lésions de type I à VI) selon le niveau de risque encouru par le patient et ainsi définir le traitement adéquat.[8,9]

1.1.3. Les traitements de l'athérosclérose

Pour des lésions légères, l'athérosclérose peut être contrôlée en réduisant les facteurs de risques et à l'aide d'une prise médicamenteuse.[6,9] Cependant pour des lésions plus complexes, un acte médical est nécessaire pour éliminer la plaque d'athérome. Les pratiques les plus courantes sont :

*L'a*ngioplastie

L'angioplastie par ballonnet a été la première technique utilisée contre la sténose artérielle.[10] Elle consiste à introduire un cathéter à travers une incision faite dans l'artère fémorale (jambe), le plus souvent. Au bout du cathéter se trouve un ballonnet qui une fois gonflé viendra compresser et éventuellement fracturer la plaque d'athérome (Figure 4.d). De nos jours, il s'agit de la technique la plus accessible, couramment utilisée à elle seule pour des lésions bénignes (types I et II). Elle est souvent associée à d'autres traitements médicaux et suivie de la pose d'un stent (Figure 4.e). La pose du stent s'effectue par angioplastie coronarienne transluminale percutanée (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, PTCA en anglais) durant laquelle le ballonnet du cathéter est serti d'un stent. De même façon que pour l'angioplastie à ballonnet simple, une fois le ballonnet gonflé, le stent est déployé puis reste en place après dégonflement et rétraction du cathéter. La première implantation de stent dans une artère coronaire chez l'homme a été effectuée par Sigwart et al. en 1986.[11] De nos jours, plus de 95 % des angioplasties sont complétées par la pose d'un stent, en une seule étape, ou précédées par une angioplastie par ballonnet simple afin de diminuer l'épaisseur de la plaque.

L*'athérectomie*

L'athérectomie est une alternative à l'angioplastie, lors de laquelle le cathéter est doté d'un embout coupant qui sert à éliminer le tissu malade. Il existe trois principaux types d'athérectomies[12] :

- L'athérectomie rotationnelle : au bout du cathéter est placée une fraiseuse qui va meuler la plaque durcie en particules minuscules pouvant être éliminées par l'organisme (Figure 4.c).
- L'athérectomie directionnelle : au bout du cathéter se trouvent un ballonnet et une lame. Le ballonnet gonflé met en contact la lame avec la plaque qui sera découpée, conservée dans une capsule spéciale puis retirée avec le cathéter.
- L'athérectomie transluminale : des lames rotatives sont posées au bout du cathéter qui est relié à un dispositif de vide. La plaque est alors découpée et les débris aspirés par le cathéter.

L'endartériectomie et le pontage artériel

Lorsque la plaque d'athérome est trop importante (lésions IV à VI), une chirurgie est nécessaire. L'endartériectomie consiste à inciser l'artère et retirer la plaque d'athérome, puis la recoudre. Dans le cas où l'artère est trop endommagée, un pontage est réalisé par l'implantation d'une déviation en amont et en aval de la lésion, suivi de l'ablation ou non de la partie sténosée. Le pontage peut se faire à l'aide d'une prothèse synthétique ou d'un segment de veine saphène (veine de la jambe) lorsque l'artère malade est de grand diamètre.

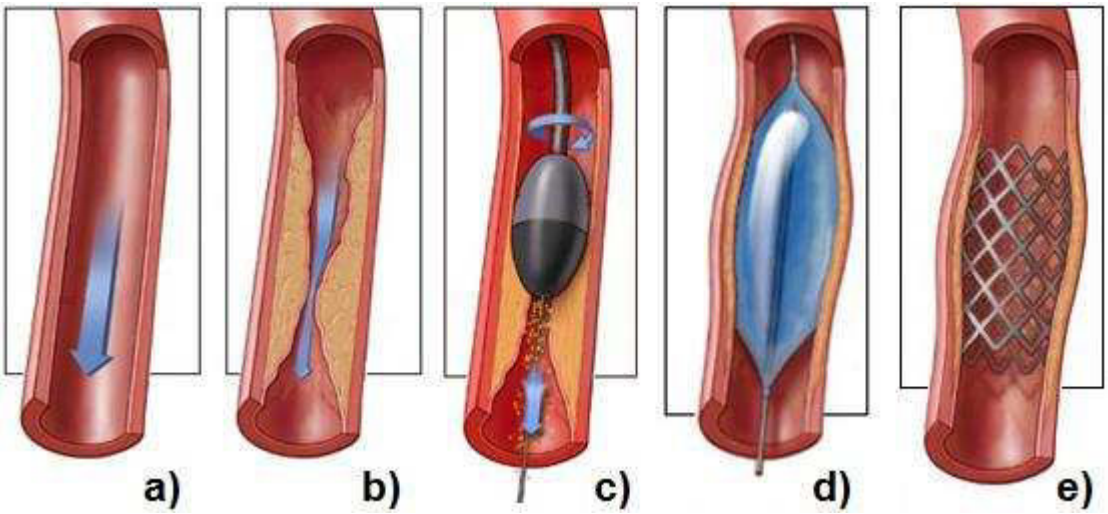


Figure 4 : Traitements mécaniques de l'athérosclérose. a) artère saine, b) artère sténosée, c) athérectomie rotationnelle, d) angioplastie par ballonnet, e) angioplastie avec pose de stent. Adaptée de ©Healthwise, Incorporated.[13]

Ces procédures sont très courantes dans le domaine médical et représentent une part importante du marché des dispositifs médicaux. D'après une étude publiée en novembre 2010 par Fuji-Keizai U.S.A.,[14] les ventes de stents et de vaisseaux artificiels confondues représentaient 5,8 milliards de dollars américains en 2009, soit environ 25% des marchés globaux des dispositifs médicaux, européen et américain. Aux Etats-Unis, plus d'un million de stents sont implantés chaque année. En France plus de 190 000 d'entre eux furent implantés en 2006.[15,16]

1.1.4. Les dispositifs médicaux liés aux maladies cardiovasculaires

La fonction que tiendront les dispositifs médicaux détermine les exigences, sorte de « cahier des charges », que doivent suivre ces dispositifs depuis leur conception jusqu'à leur utilisation. Comme mentionné précédemment, pour le traitement des maladies cardiovasculaires et particulièrement de l'athérosclérose, les dispositifs les plus couramment utilisés sont les cathéters, les stents et les prothèses synthétiques. Comme pour la majorité des biomatériaux, ces dispositifs doivent posséder certaines propriétés comme être visibles aux rayons X (radio-opaque), être stérilisables et de plus en plus souvent, le conditionnement et le prix jouent un rôle prépondérant. Il est évidemment complexe de réunir toutes ces propriétés et en cela le choix du matériau est essentiel. De plus, s'ajoutent les exigences liées à chaque application. Par exemple, aussi bien les stents que les cathéters et les prothèses, étant au contact du sang, doivent être thrombo-résistants et hémocompatibles, pour éviter la formation de thrombus.

Cathéters

Les cathéters sont des tubes souples et fins, ayant plusieurs applications médicales comme cardiovasculaires, urologiques, gastro-intestinales, neurovasculaires ou encore ophtalmiques. De ce fait, les cathéters peuvent avoir différentes fonctions comme la diffusion et le drainage de liquides, le maniement d'outils ou de matériaux implantables. Ils peuvent alors aussi bien servir pour l'évacuation de liquides corporels (urine, sang) pendant l'opération ou dans le cadre de traitements post-opératoires, ou bien diffuser des médicaments au lieu désiré ou encore permettre la pose de stents. Dans le cas de l'angioplastie ou de l'athérectomie, le cathéter permet d'amener le ballonnet ou l'embout coupant au niveau de la lésion. Les dimensions des cathéters dépendent des dimensions de l'organe visé et leurs diamètres se mesurent en French (1 French = 1/3 mm). Typiquement, un cathéter à ballonnet mesure entre 140-150 mm et 5-6 French. Afin de passer à travers les tissus et les vaisseaux, les cathéters doivent posséder une très grande trackabilité, ce qui est définit comme la capacité du dispositif à naviguer à travers l'anatomie des vaisseaux. Il doit alors être souple et élastique, mais aussi résistant aux pressions internes et externes exercées. De plus, lors de son passage, le cathéter ne doit pas accrocher de composants biologiques (tissus, cellules, sang, etc.) et vice versa. Il doit donc présenter une surface lisse, afin de limiter les forces de frottement ainsi que bio-inerte et anti-adhérente, afin d'éviter l'agglutination de composants biologiques. Les matériaux répondant à ces exigences sont des polymères dont certains exemples figurent dans le Tableau 1.[17–19]

Prothèses vasculaires synthétiques

Tel que vu précédemment, lorsque l'athérosclérose du vaisseau est trop importante et ne peut être soignée par angioplastie, un pontage ou un remplacement de vaisseaux sanguins est nécessaire. Dans ce cas, un substitut de nature biologique tel qu'une veine (autogreffe) ou de nature synthétique est utilisé pour rétablir le flux sanguin. Les prothèses synthétiques sont de forme tubulaire et suturées aux vaisseaux sanguins, afin de les remplacer ou de créer une déviation à la circulation sanguine. Elles mesurent entre 6 et 24 mm de diamètre et peuvent avoir une longueur variant entre 20 cm jusqu'à plus de 70 cm, selon l'application désirée. Plusieurs complications ont été observées pour les prothèses de petits diamètres (< 6 mm), car leur obstruction est facilitée. En effet, au contraire du cathéter, la prothèse vasculaire est un dispositif permanent et pour éviter toutes complications cliniques, ses propriétés doivent se rapprocher de celles des vaisseaux sanguins. Elle doit donc résister à la pression sanguine en possédant une viscoélasticité proche des vaisseaux naturels, mais aussi permettre l'endothélialisation, c'est-à-dire la formation d'un endothélium sur sa lumière interne. Les prothèses sont alors fabriquées à partir de différents textiles comme du PTFE tricoté ou sous forme de microfibrilles ou encore avec des fibres de PET tissées ou tricotées (Dacron). Les prothèses en Dacron et en PTFE sont les plus utilisées de nos jours. Les polyuréthanes ont été étudiés pour obtenir une souplesse se rapprochant des vaisseaux sanguins mais ces prothèses ont donné des résultats mitigés. Le Tableau 1 résume les propriétés principales requises pour ces dispositifs et quelques exemples courant de matériaux utilisés.[20–23] Ces prothèses peuvent être parfois associées à des stents, pour plus de rigidité, entre autres dans le traitement d'anévrismes.[24,25]

Stents

Un stent est un dispositif constitué de mailles et de forme tubulaire, servant de support mécanique à l'artère après une angioplastie. Un stent coronarien mesure entre 8 et 30 mm de long et 2 à 5 mm de diamètre, pour une épaisseur de mailles de l'ordre de 50 µm pour des stents métalliques nu. Plusieurs géométries existent, les plus courantes étant les mailles découpées au laser dans un cylindre extrudé, mais il existe aussi des stents composés de plusieurs segments soudés entre eux, ou encore possédant un monofilament en spirale et certains auto-expansibles. La géométrie et la structure du stent sont des facteurs importants liés à son recul élastique et sa rigidité : une fois déployé, le stent ne doit pas se compresser de nouveau et doit supporter l'artère. De plus, tout comme le cathéter sur lequel il est serti, le stent doit avoir une bonne trackabilité (capacité à progresser selon l'anatomie des vaisseaux) et donc une flexibilité suffisante, pour lui permettre d'épouser la forme du vaisseau une fois en place, par ailleurs. Outre des propriétés mécaniques et physiques, étant un dispositif permanent, on s'attend à ce qu'il favorise la ré-endothélialisation de la lésion, au même titre que les prothèses synthétiques. Les stents sont majoritairement fabriqués à partir de métaux et d'alliages métalliques. Parmi les stents métalliques, la recherche se porte sur des stents biodégradables en fer ou magnésium, voués à disparaître une fois leur fonction achevée. L'acier a été très utilisé comme matériau au début, mais maintenant il existe de plus en plus de nouveaux matériaux comme les alliages de nickel et titane (nitinol à mémoire de forme), les alliages colbalt-chrome, le tantale ou le titane. Ces métaux visent à améliorer les propriétés des stents métalliques existants, en particulier la visibilité (radio-opacité ou fluoroscopie dans le cas du tantale), la non-toxicité ou encore la compatibilité vasculaire.[25–29] Une liste non exhaustive des caractéristiques requises pour les stents et des matériaux utilisés est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Cahier des charges et matériaux pour la confection de dispositifs médicaux.

	Caractéristiques requises		**Matériaux**
	Générales	**Spécifiques**	
Cathéters	- Thrombo-résistant, hémocompatible - Flexible - Radio-opaque - Stérilisable - Conditionnable	- Bio-inerte - Souple et élastique - Résistant aux débits injectés - Lisse - Antiadhérent	Polydiméthylsiloxane (PDMS), Silicone Polychlorure de vinyle (PVC) Latex Polyuréthanes (PU) Polyéthylène (PE) Polytétrafluoroéthylène (PTFE), Téflon
Prothèses vasculaires synthétiques		- Souple et résistant - Résistants aux débits sanguins élevés - Viscoélasticité similaire aux vaisseaux sanguins	Polytétrafluoroéthylène (PTFE), Téflon Polytéréphtalate d'éthylène (PET), Dacron Polyuréthanes (PU) Polypropylène (PP)

Stent		- Conformabilité - Recul élastique faible	**Non-dégradables :** Acier inoxydable Ni-Ti, Nitinol Alliage Co-Cr Pt-Ir Ta **Dégradables :** Fe Mg Alliage Fe-Mn Poly-D/L lactic acid

Malheureusement, il difficile, voire quasi impossible, de créer le dispositif idéal réunissant toutes les exigences chimiques, physiques, mécaniques et cliniques en un seul matériau. Il faut alors trouver un compromis entre toutes les propriétés requises. Cependant, bien que les aspects physiques et mécaniques puissent être respectés, il survient encore des complications cliniques qui peuvent être liées à la nature du matériau utilisé, mais aussi à la conception du dispositif (forme, dimension, topographie, etc.) ou encore au patient, comme les allergies.

1.2. Les complications cliniques et leurs solutions : les revêtements de surface

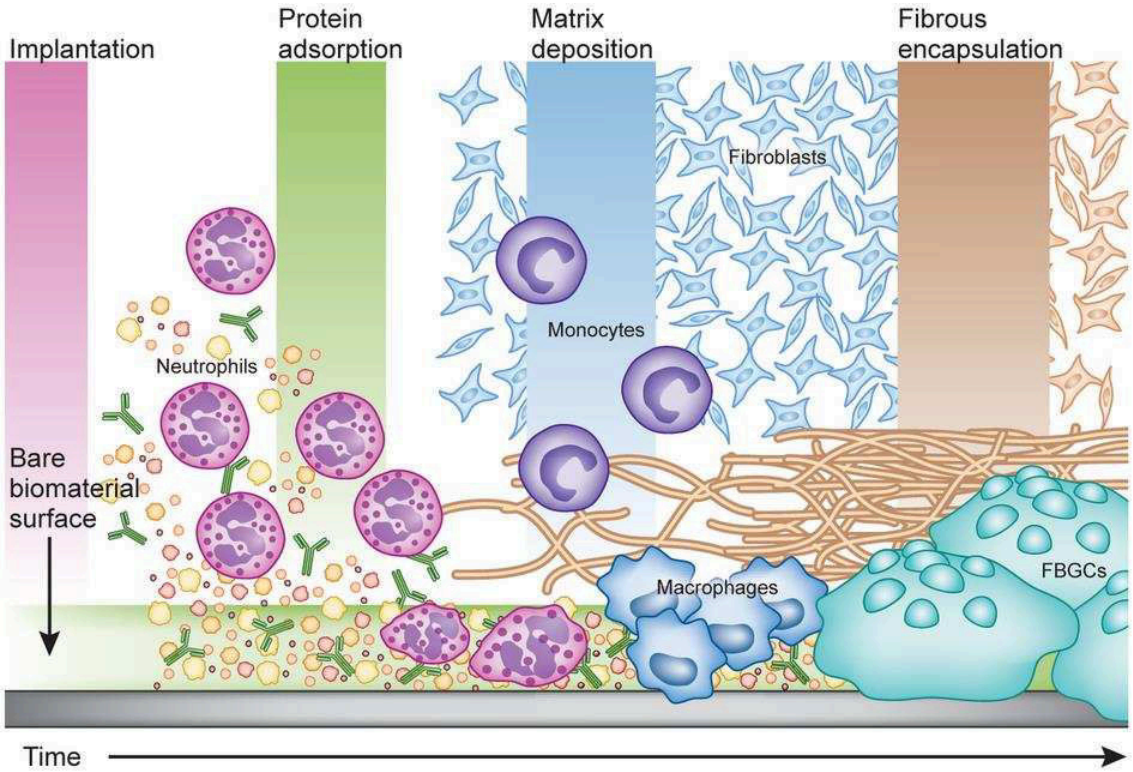
1.2.1. Les complications cliniques

L'inflammation en réaction à un corps étranger

Lors de l'implantation d'un dispositif médical, la première réponse biologique produite est l'inflammation. Deux types d'inflammation peuvent être distingués : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est la réponse immédiate du système immunitaire face à un agresseur et se caractérise par la formation d'exsudats, la congestion vasculaire et l'infiltration de neutrophiles, qui mène à une guérison spontanée. Au contraire, l'inflammation chronique est un processus d'inflammation qui persiste et n'a aucune tendance à la guérison spontanée. En effet, le système immunitaire reconnait le dispositif comme un corps étranger et enclenche un processus de cicatrisation qui va se prolonger jusqu'à produire une capsule distincte avasculaire autour de l'implant contenant majoritairement du collagène. La réponse inflammatoire directe est le début de plusieurs phénomènes biologiques (ex. la resténose). Elle se déroule en plusieurs phases :

- Adsorption de **protéines** : Le tout premier phénomène survenant lors du contact du matériau avec un milieu physiologique est l'adsorption immédiate de protéines à sa surface. Parmi ces protéines se trouvent des molécules bioactives qui vont interagir avec les cellules environnantes. Il y a alors production de molécules messagers (ex. cytokines, facteurs de croissance, etc.) qui vont permettre le recrutement des cellules de l'inflammation.

- En premier lieu, ce sont les **neutrophiles** qui sont recrutés et qui vont être activés à leur contact avec la surface de l'implant et vont, à leur tour, diffuser des molécules messagers.
- Deuxièmement se produit le recrutement des macrophages du tissu conjonctif environnant (mastocytes) et des monocytes circulants du sang, qui se différencient par la suite en macrophages. **L'activité phagocytaire** de ces cellules est entravée par leur incapacité à digérer et retirer le corps étranger.
- De ce fait, les macrophages fusionnent entre eux pour former des **cellules géantes** à la surface du matériau tout en sécrétant des facteurs qui recrutent et activent les **fibroblastes**.
- Les fibroblastes produisent alors de la matrice extracellulaire et du collagène, qui évolue en **une capsule dense et fibreuse** autour de l'implant (tissu de granulation), l'isolant ainsi de l'environnement hôte.



Traduction de l'image de haut en bas : Implantation – Implantation ; Protein adsorption – Adsorption de protéines ; Matrix deposition – Dépôt de matrice ; Fibrous encapsulation – Encapsulation fibreuse ; Fibroblasts- Fibroblastes ; Neutrophils – Neutrophiles ; Monocytes – Monocytes ; Macrophages – Macrophages ; FBGCs (foreign-body giant cells) – Cellules géantes à corps étranger ; Bare biomaterial surface – Surface nue de biomatériau ; Time - Temps.

Figure 5 : Réponse inflammatoire à un corps étranger. A l'implantation du matériau se forme une couche de protéines adsorbées à la surface qui va mener au recrutement de phagocytes et de fibroblastes qui vont produire une matrice de collagène qui évolue jusqu'à l'encapsulation de l'implant par une matrice fibreuse.[30]

Par son manque de vascularisation, cette capsule peut être imperméable aux cellules et entraver le transport des métabolites. Cela entraîne un processus de guérison lent, une résistance à l'intégration du dispositif et peut aussi créer des niches susceptibles de s'infecter, pouvant mener à l'échec de l'implant. Il a été observé que les

réactions inflammatoires étaient plus virulentes au contact des matériaux polymériques comparés aux matériaux métalliques.[31] L'allergie à certains composants peut aussi être à l'origine de réactions inflammatoires. Il a été observé plusieurs cas d'allergies aux cathéters en latex ou en PVC. En effet, pour donner sa souplesse au PVC des additifs sont ajoutés et peuvent être relargués provoquant une réaction allergique.[18] Pour certains stents en acier, une réaction allergique serait survenue suite au relargage de nickel.[31]

L'infection bactérienne

L'origine principale de l'échec d'un implant suite à une infection bactérienne provient de bactéries à l'état planctonique, c'est-à-dire des bactéries circulantes qui ont été introduites dans l'organisme suite à la contamination des dispositifs manipulés ou de la peau du patient. Elles peuvent alors former un biofilm qui peut mener au rejet de l'implant. Le processus de formation du biofilm peut se découper en trois étapes :

- **L'attachement** : Les bactéries planctoniques vont interagir avec la surface pour donner un premier attachement réversible qui devient irréversible, dans un second temps, par la formation de ligands entre la bactérie et la surface.
- **La maturation** : Les bactéries vont alors se diviser et former des micro-colonies qui vont se regrouper. Les bactéries sécrètent alors le biofilm proprement dit, qui est une matrice de polysaccharides de la matrice extracellulaire.
- **Dispersion** : A un certain point de maturation, les bactéries peuvent se détacher du biofilm et retrouver un état planctonique, pouvant coloniser d'autres lieux.

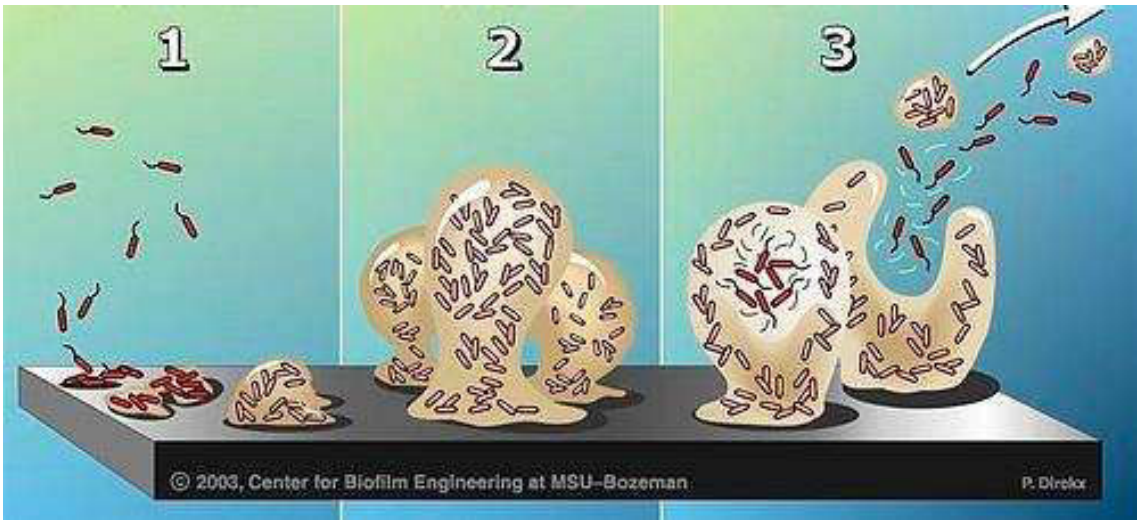


Figure 6 : Formation d'un biofilm en 3 étapes. 1) attachement des bactéries à la surface. 2) croissance et maturation du biofilm. 3) détachement des bactéries pour une nouvelle colonisation.[32]

Le biofilm offre une forte protection aux bactéries contre les antibiotiques, les rendant difficiles à éliminer. Peu d'infections liées aux stents ont été observées, toutefois il s'agit d'un problème récurrent pour les cathéters et les prothèses synthétiques.[33] Lors d'une opération, il est difficile d'assurer l'entière stérilité de l'environnement

de travail et l'infiltration de bactéries de la peau, comme staphylococcus epidermidis et pseudomonas aeruginosa, peut provoquer des infections chroniques virulentes, suite à l'utilisation de cathéters veineux ou urinaire. Les deux autres types de bactéries les plus connus pour être à l'origine d'infections nosocomiales sont les staphylococcus aureus et escherichia coli, qui sont, entre autres, responsables de plusieurs échecs de prothèses synthétiques (greffe vasculaire, accès d'hémodialyse, pontage, etc.).[22,34]

La resténose

La resténose est un phénomène apparaissant dans les six mois suivant une angioplastie et implique un nouveau rétrécissement de l'artère. Les mécanismes biologiques et cellulaires impliqués en cas de resténose sont différents de ceux impliqués dans la formation d'une plaque d'athérome. Ceux-ci sont encore mal connus, mais on peut toutefois définir la resténose comme étant « la réponse cicatricielle à une lésion artérielle intervenue pendant la revascularisation coronarienne transluminale ».[12] La resténose implique trois processus : le recul élastique, l'hyperplasie et le remodelage. Le recul élastique est compris comme étant la re-constriction de l'artère suite à sa dilatation due à l'angioplastie.[35]

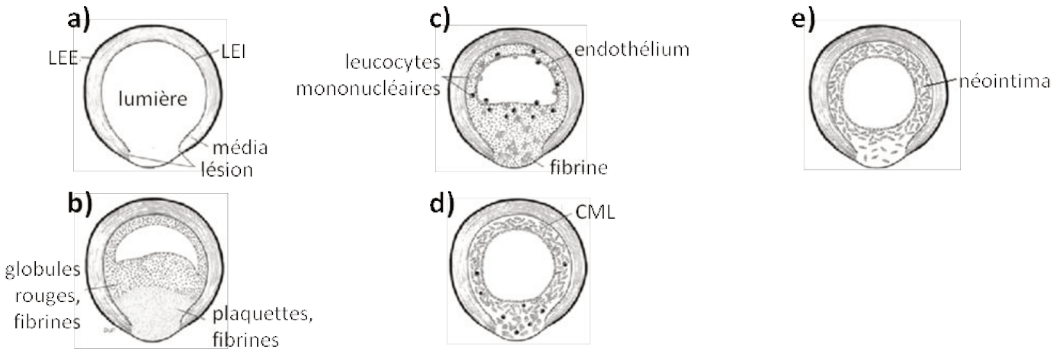


Figure 7 : Phases de l'hyperplasie néotintimale. a) lésion aigüe. b) phase de thrombose. c) phase de migration. d) phase de prolifération. e) néointima mature. LEE – limitante élastique externe, LEI – limitante élastique interne, CML – cellules musculaires lisses. Adaptée de Schwatz et al.[32]

L'hyperplasie est la formation d'un nouvel intima et se déroule en trois phases :

- **Phase de thrombose** : La réponse immédiate (réponse inflammatoire) aux dissections des tissus artériels est la formation d'un thrombus initié par l'activation des plaquettes du sang qui viennent s'agréger au niveau de la lésion (hémostase). Ce thrombus est essentiellement formé de fibrines et de plaquettes formant une matrice dans laquelle sont piégés des érythrocytes. (Figure 7.b)
- **Phase de migration** : Les premières cellules à migrer sont les cellules endothéliales qui viennent former un nouvel endothélium à la surface du thrombus. Puis il y a infiltration de leucocytes mononucléaires, principalement des macrophages et des lymphocytes, qui vont entraîner la dégénérescence du thrombus (résorption partielle). Le thrombus associé aux leucocytes forme une importante source de molécules messagers qui favorise le recrutement cellulaire. (Figure 7.c)

- **Phase de prolifération** : Le thrombus dégénérescent est colonisé par des fibroblastes et des cellules musculaires lisses provenant de la média et il y a production abondante de matrice extracellulaire. Le thrombus et les leucocytes vont peu à peu se résorber pour laisser place à cette nouvelle « couche » qui va s'épaissir et évoluer jusqu'à l'obtention d'un néo-intima stable et compléter la cicatrisation de la paroi vasculaire. (Figure 7.d)

Parallèlement à cette croissance néointimale, l'artère subit un remodelage qui réorganise les différentes tuniques afin de s'adapter son calibre luminal en réponse aux situations imposées.[36,37] Si la pose d'un stent permet de contrer le recul élastique et de limiter le remodelage de l'artère, l'hyperplasie reste une complication présente dans l'utilisation de stents, et qui se retrouve aussi pour les prothèses synthétiques. L'acteur majeur de ce phénomène est la prolifération incontrôlée de cellules musculaires lisses. Certaines techniques sont utilisées après implantation pour limiter cette prolifération comme la brachythérapie, en utilisant des radiations, ou encore la thérapie génique, en modifiant l'expression des gènes.[38,39]

1.2.2. L'adhérence cellulaire

L'interaction cellulaire avec la surface du biomatériau est un facteur déterminant dans le succès de celui-ci. Parvenir à contrôler la réponse cellulaire par le seul effet du biomatériau, en particulier de sa surface, permettrait de réduire un bon nombre des complications cliniques observées après implantation. Pour cela, il est important de comprendre quels sont les facteurs qui influent sur l'adhérence cellulaire à une surface. Bien que les processus biologiques ne soient pas complètement expliqués, la recherche a défini une partie des mécanismes de l'adhérence cellulaire, qui vont dépendre à la fois des facteurs liés aux éléments biologiques (protéines et cellules) mais aussi aux facteurs liés à la surface du matériau.

Les protéines

Tel que vu précédemment, le premier phénomène survenant lors du contact du matériau avec l'organisme est l'adsorption de protéines. Les protéines et les autres molécules sont constamment en compétition l'une avec l'autre versus les sites de liaison de la surface. L'effet Vroman stipule que les molécules petites et abondantes vont s'adsorber en premier lieu. Cependant, avec le temps, les molécules ayant une plus haute affinité avec la surface viendront les remplacer même si elles sont plus grandes et moins nombreuses. L'attachement des protéines est alors amplifié par la présence de plus fortes interactions. A ce moment, l'un des facteurs influents peut être la taille des protéines. En effet, une plus grande protéine offre plus de surface disponible pour de plus nombreuses interactions. Les protéines vont par la suite adapter leur conformation en fonction de leur affinité avec la surface. Plusieurs facteurs liés à la surface entre alors en jeu, comme les interactions ioniques et électrostatiques qui dépendent aussi du pKa de la protéine, les liaisons hydrogènes qui possèdent cependant une faible stabilité en milieu aqueux, les interactions hydrophobiques basées sur les interactions entropiques ou encore les transferts de charges entre donneur-accepteur d'électrons.[40]

L'adsorption de protéines et d'autres composants (ex. polysaccharides) à la surface du matériau forme alors un film de conditionnement qui sera déterminant pour l'adhérence cellulaire.

Les cellules mammifères et les bactéries

L'adhérence des cellules mammifères est induite par l'interaction protéine-protéine entre les protéines récepteurs d'adhérence de la membrane cellulaire (intégrines) et les protéines ligands du film de conditionnement. Ensuite, dans des conditions favorables, les cellules vont progressivement s'étaler grâce à la formation de filaments d'actine qui vont servir de points d'ancrage à la surface. L'attachement cellulaire peut se renforcer jusqu'à la formation de points focaux et dans ce cas les cellules peuvent imposer une contrainte mécanique au matériau de surface. La prolifération cellulaire peut alors avoir lieu et être plus ou moins importante en fonction de l'affinité des cellules avec la surface.[41]

De même que pour les cellules mammifères, les bactéries vont interagir avec le film de conditionnement via les adhésines présentes sur leur membrane cellulaire et former des ligands pour renforcer leur attachement (attachement irréversible).[42–44]

L'affinité cellule-surface est régie par plusieurs facteurs similaires pour les deux types de cellules à savoir des interactions ioniques électrostatiques, hydrophobiques et des interactions liées à la topographie. D'un point de vue biologique, il est reconnu qu'en général les cellules mammifères et les bactéries ont le plus souvent une membrane chargée négativement en milieu aqueux, charge qui dépend de plusieurs facteurs comme le type de cellules, l'âge de la cellule, le pH du milieu, etc. Le type de cellule détermine la structure de surface de la membrane cellulaire qui influe aussi sur l'adhérence. Dans le cas des bactéries, elles peuvent être divisées en deux groupes : les GRAM +, qui possèdent une couche épaisse de protéoglycanes sur leur membrane externe (staphylococcus aureus, staphylococcus epidermis), et les GRAM – qui en possèdent une plus fine interne (escherichia coli, pseudomonas aeruginosa). Il est reconnu aussi que les bactéries ont majoritairement une membrane hydrophobe. D'un point de vue de la surface, les facteurs principaux agissant sur l'adhérence cellulaire et leurs conséquences sont regroupés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les facteurs influençant l'adhérence cellulaires.

Interactions	Cellules mammifères	Bactéries
Electrostatique et charge de surface	Les surfaces chargées négativement limitent l'adhérence	
Energie de surface **Hydrophobicité / Hydrophilicité**	L'augmentation de l'énergie favorise l'adhérence - les surfaces hydrophiles forment un film aqueux empêchant l'adhérence - les surfaces hyper-hydrophobes empêchent tout contact - les interactions hydrophobe-hydrophobe favorisent l'adhérence	
Topographie	Les surfaces très lisses limitent l'adhérence	Les petites rugosités favorisent l'adhérence
Répulsion stérique	Le greffage de molécules flexibles empêche l'adhérence et augmente souvent l'hydrophilicité	

1.2.3. Les revêtements pour moduler la réponse biologique

La bio-intégration est l'aboutissement idéal espéré pour les biomatériaux. Cela implique que l'interface entre le dispositif et le milieu biologique n'induise pas de réactions indésirables. Cependant, comme vu dans les sections précédentes, il est un réel défi que de trouver le matériau aboutissant au meilleur compromis entre propriétés mécaniques et propriétés biologiques, par exemple. Les matériaux utilisés pour la fabrication de dispositifs médicaux peuvent alors entraîner des complications cliniques qui mettent en jeu l'activation et l'adhérence de différentes cellules. Les chapitres précédents présentaient certaines complications cliniques et les moteurs cellulaires qui y sont impliqués ainsi que les facteurs influençant l'adhérence cellulaire. Le Tableau 3 fait un résumé des manifestations cellulaires majeures responsables de ces complications ainsi que des dispositifs les plus concernés par celles-ci et des stratégies les plus communément envisagées afin d'y remédier. Ces stratégies visent, en grande partie, à moduler l'adhérence cellulaire et protéique.

Tableau 3 : Résumé des complications cliniques et de leurs manifestations biologiques principales, ainsi que des dispositifs principaux concernés par chaque complication et des stratégies envisagées pour y remédier.

Complications	Manifestations principales	Dispositifs principaux concernés	Stratégies prépondérantes
Inflammation Hypersensibilité Allergie	Réponse immunitaire Encapsulation fibreuse (collagène, fibrine, fibroblastes)	Réaction aigüe due aux polymères des PVS*. Allergies au Ni des stents au Nitinol ou aux additifs des cathéters en latex.	Réduire l'adsorption de protéines actives Empêcher l'adhérence et l'activation des fibroblastes Empêcher le relargage d'allergène
Thrombose	Agrégation de plaquettes	Incrustation des cathéters en PDMS*. Thrombose tardive des stents et PVS.	Empêcher l'adhérence et l'activation des plaquettes
Resténose	Prolifération de CML*	Re-sténose intra-stent des stents métalliques nus et des PVS	Favoriser la ré-endothélialisation rapide Empêcher la prolifération des CML
Infection	Formation de biofilm	Cathéter de PDMS par E. Coli et S. Aureus	Empêcher l'adhérence de bactéries

*PVS – prothèses vasculaires synthétiques ; PDMS – polydiméthylsiloxane ; CML – cellules musculaires lisses.

Afin de limiter ces complications tout en conservant les propriétés de volume des matériaux, une approche est de modifier la surface des dispositifs avec des revêtements capables de moduler la réponse biologique en fonction de facteurs physico-chimiques et biologiques. Les types de revêtements se regroupent en deux grandes classes :

- **Les revêtements passifs** : ce sont des revêtements principalement composés de matériaux inertes chimiquement et biologiquement ainsi que des matériaux aux propriétés anti-adhérentes. Ces

propriétés peuvent être dues à la nature même du matériau, comme les polyuréthanes, ou au mode de fabrication du revêtement, comme les chaînes greffées de polyéthylène glycol (PEG).

- **Les revêtements proactifs** : leur fonction principale est d'induire une réponse cellulaire spécifique. Ces revêtements peuvent stimuler ou inhiber l'adhérence, la migration et la prolifération de cellules en particulier. Ils peuvent être séparés en trois catégories :
    1) Ceux composés de **polymères naturels** qui possèdent des propriétés biologiques, comme l'héparine qui est anticoagulante.
    2) Ceux composés de **molécules bioactives** comme, des facteurs de croissance qui vont stimuler la migration et la prolifération des cellules endothéliales.
    3) Ceux dont le revêtement est chargé de **principes actifs qui diffusent** comme des anti-inflammatoires ou antibiotiques.

Des exemples de ces revêtements sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résumé des principaux revêtements présents dans la littérature.

Les sigles utilisés dans ce tableau sont développés en fin de tableau.

	Dispositifs	Revêtements	Résultats
Passif	Stent	Or	Haute biocompatibilité et traçabilité. Diminue thrombogénicité et prolifération néointimale in vivo. Pas d'amélioration de resténose par rapport aux stents en acier inoxydable dans les études cliniques.[27,45–47]
	Stent	Nitrure de titane	Réduit adhérence plaquettes et fibrinogène. Pas d'amélioration d'endothélialisation.[29,47]
	Stent Cathéter	DLC	Diminue thrombogénicité et prolifération néointimale. Anti-adhérent, souvent associé à Ag pour augmenter ses propriétés antibactériennes.[29,43,45,47,48]
	Stent	Carbure de Silicium	Semi-conducteur. Abaisse les risques d'incidents coronaires sévères et l'adhérence plaquettaire.[29,45–47]
	Stent PVS	PU PET	PU étudiés pour améliorer les propriétés thrombogènes du Ta, la résistance à la corrosion du NiTi et la biocompatibilité des 316L. Aucune incidence sur le taux de resténose n'a été observée pour ces polymères.[11,27]
	Stent PVS Cathéter	PEG	Surface anti-adhérence. Les chaînes flexibles de PEG offrent un obstacle à l'adsorption de protéines, les plaquettes, cellules et bactéries.[49,50]
	PVS	CMD	Surface anti-adhérence. Flexibilité et charge de CMD créent une gêne stérique et limite l'adsorption de protéines et cellules.[51,52]
	Cathéter	Sulfobetaine	Zwitterion associé à des polymères acrylates pour des surfaces résistantes à l'adhérence de protéines, plaquettes et bactéries.[53–56]
	Stent PVS Cathéter	Phosphoryl-choline	Sous forme de copolymères avec des polyacrylates. Pour produire des surfaces biomimétiques. Résistant à l'adsorption de plaquettes et protéines. Les résultats ne sont pas meilleurs que l'acier inoxydable pour les stents. Bon candidat pour les DES.[45–47,57,58]

Proactif	Stent PVS Cathéter	Héparine	Très utilisée pour ses propriétés anticoagulantes, complexée à des polymères cationiques ou greffée à la surface. Pas d'amélioration de la thrombose ou de la resténose comparé à un stent en acier. Plus utilisée pour l'élution médicamenteuse.[2–4]
	Stent	Chitosane Acide hyaluronique	HA permet de limiter l'hyperplasie. Le revêtement CH-PEO-HA limite adhérence des plaquettes.[2–4]
	PVS	Collagène, gélatine	Imperméabilisation de la prothèse. Améliore l'endothélialisation, lié à des facteurs de croissance (bFGF, VEGF). Matrice pour élution médicamenteuse.[20,22,59,60]
	Stent PVS	Fibronectine	Améliore l'endothélialisation.[27,31]
	Stent PVS	VEGF, bFGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales et fibroblastes pour améliorer l'endothélialisation.[31,60]
	Stent PVS	RGD	Peptide modulant l'adhérence cellulaire. Souvent greffé à des polymères anti-adhérents comme le CMD ou le PEG pour éviter l'adsorption non-spécifique et ne stimuler que l'adhérence des cellules endothéliales.[61,62]
	Stent PVS	Cellules	Recouvrement avec des cellules endothéliales et musculaires lisses pour améliorer la bio-intégration.[22,31]

PVS – Prothèse vasculaire synthétique, DLC – diamond-like carbon, PU – polyuréthanes, PET – polytéréphtalate d'éthylène, PEG/PEO – polyéthylène glycol, CMD – carboxyméthyldextrane, CH – chitosane, HA – acide hyaluronique, bFGF – facteur de croissance des fibroblastes, VEGF – *Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, DES* – stent à élution médicamenteuse.

Libération de principes actifs

Souvent, le revêtement en lui-même ne permet pas de réduire suffisamment les réactions indésirables. Toutefois, de meilleurs résultats sont obtenus cliniquement lorsque la libération de principes actifs est additionnée aux propriétés de surface du revêtement. De nos jours, les dispositifs à libération sont les plus commercialisés et utilisés en milieu clinique.[14] Les stents à élution médicamenteuse (DES, de l'anglais Drug Eluting Stent) ont montré une nette diminution du taux de resténose (< 10%), majoritairement par la libération de molécules antiprolifératives. Les prothèses de Dacron recouvertes de collagène chargé d'héparine ont significativement amélioré l'endothélialisation et la bio-intégration des prothèses. Un des avantages majeurs de la libération de principes actifs est de livrer directement au site affecté et donc, comparativement à la voie orale ou l'injection, d'introduire une quantité de principes actifs plus faible. De plus, elles peuvent représenter une solution pour les lésions complexes. Leur efficacité dépend de plusieurs facteurs notamment de la physiologie du site (artère ou veine), de la pharmacologie du principe actif (spécificité ou puissance) ou de la formulation (dose, vitesse de libération, biodisponibilité, durée). Les principes actifs les plus communs sont :

- Les anticoagulants (héparine)
- Les immunosuppresseurs (sirolimus, rapamycin)
- Les antiprolifératifs (paclitaxel)
- Les antibiotiques (rifampin)
- Les bactéricides (argent)

Plusieurs techniques pour la libération existent. Une des premières utilisées a été d'imprégner le dispositif d'une solution de principe actif. Cette technique a vite été abandonnée, car tout le principe actif était éliminé pendant la manipulation du dispositif à travers le milieu physiologique. La technique la plus courante de nos jours est d'utiliser une matrice polymérique chargée de principe actif. Les polymères utilisés sont soit des polymères non-dégradables, comme le PBMA, ou dégradables, comme le PLLA.

Les méthodes de recouvrement

L'étape de recouvrement d'un dispositif est cruciale quant aux propriétés attendues. En effet, les propriétés biologiques des revêtements dépendent fortement du mode de fabrication. Ainsi, il doit éviter de dénaturer la molécule utilisée, par exemple, ou encore de permettre d'obtenir les propriétés voulues, comme l'anti-adhérence des revêtements de PEG qui est liée à la flexibilité des chaînes greffées. Les méthodes de recouvrements utilisent des principes simples tels que la formation d'un film par évaporation d'une solution, le traitement plasma, le greffage covalent ou encore l'interaction électronique ou ionique. Des exemples de méthodes de base sont présentés dans le Tableau 5. Par la suite, ces méthodes de base peuvent être additionnées pour créer de nouvelles structures plus complexes.

Tableau 5 : Méthodes de recouvrement de surfaces.

Méthode	Description
Dip coating	Simple et rapide, consiste à tremper la surface dans une solution. Très utilisée pour le dépôt de protéines et de polymères naturels, par physisorption. Utilisé pour la formation de revêtements Layer-by-Layer.[63] Généralement, faible adhérence au substrat et peut être arraché lors de la mise en place de l'implant.
Spray coating	Une solution est pulvérisée sur la surface. Permet d'obtenir des films fins de polymères. Peut montrer une faible adhérence au substrat lors du déploiement du stent.[64,65]
Spin coating	Une solution est déposée sur une surface qui tourne. Permet d'obtenir des films fins de polymères. Ne fonctionne que pour des géométries planes. Peut montrer une faible adhérence au substrat.
Traitement plasma	Permet de déposer des films ultrafins (nanomètres) et hautement adhérents, aussi de fonctionnaliser la surface avec des groupements chimiques.[66]
Greffage	Permet de former des liens covalents entre la surface et le revêtement en utilisant les méthodes précédentes. Souvent la surface est fonctionnalisée en solution ou par plasma, dans un premier temps, puis la molécule pour le revêtement est greffée par chimie en solution. Meilleure stabilité, homogénéité du revêtement dépend beaucoup de la fonctionnalisation de la surface. La méthode de greffage doit prendre en compte la disponibilité de la ou des molécules face aux cellules.

2. Le projet : Recouvrements à base de dextrane pour applications médicales

L'objectif de ce projet était d'étudier les possibilités de greffage d'un copolymère à base de dextrane-PBMA à des surfaces métalliques pour concevoir un revêtement en vue d'applications biomédicales, plus spécifiquement cardiovasculaires. Pour l'application aux stents vasculaires, ce revêtement devait répondre aux problématiques existantes et présenter les propriétés suivantes :

- Etre stable à long terme, grâce à un greffage covalent qui permet d'augmenter le maintien du revêtement à la surface.
- Avoir une bonne tenue à la déformation due aux propriétés viscoélastiques du copolymère, afin d'éviter le délaminage et le déchirement des revêtements lors du déploiement du stent.
- Diminuer l'hyperplasie, en favorisant l'endothélialisation tout en limitant la prolifération des cellules musculaires lisses.

L'approche générale était de former des liens covalents entre le substrat et la partie dextrane du copolymère. Pour ce faire, un substrat d'acier recouvert d'une couche de simili-PTFE (CF_x) a été fonctionnalisé, d'une part. D'autre part, le dextrane a été modifié, afin de pouvoir réagir avec la surface fonctionnalisée, puis le copolymère a été synthétisé à partir de ce dextrane modifié.

Dans cette optique, le travail effectué a mené à l'étude :

- de la synthèse et la caractérisation de polymères de dextrane modifiés et de copolymères à base de dextrane modifié,
- de l'influence de la modification du dextrane sur l'efficacité du greffage et sur la fabrication de revêtements (chaîne de polymère greffée ou film copolymère),
- des propriétés mécaniques et biologiques des polymères produits.

2.1. Les substrats

La première partie de la méthodologie proposée dans ce projet consiste à greffer des chaînes de dextrane modifiées à une surface. Dans le cadre de l'application aux stents, le substrat initialement choisi était de l'acier inoxydable 316L recouvert par plasma d'un polymère fluorocarboné (CF_x). Le PTFE, de structure chimique similaire au CF_x, a aussi été utilisé, principalement dans le but d'effectuer les optimisations de greffage en un temps plus court en évitant le procédé à étapes multiples de dépôt de CF_x.

2.1.1. L'acier inoxydable 316 L

L'acier inoxydable 316L a été, jusqu'à récemment, le métal le plus utilisé pour la fabrication de stents pour des raisons techniques et économiques,[14,67] d'où le choix de ce matériau pour ce projet. La composition chimique ainsi que les principales propriétés mécaniques de l'acier inoxydable 316L sont détaillées dans le Tableau 6 et le Tableau 7. Le chrome confère à l'acier inoxydable sa résistance à la corrosion par le biais d'une couche surfacique d'oxyde de chrome majoritairement sous forme Cr_2O_3.[68] Toutefois malgré de très bonnes propriétés mécaniques, le taux de resténose des stents nus en acier reste élevé (30-40 %). De plus, le contact avec le sang peut provoquer une corrosion pouvant mener, à la fois, à la perte de ses propriétés mécaniques, mais aussi au relargage de substances allergènes comme le molybdène et le nickel.[69]

Tableau 6 : Composition massique de l'acier inoxydable 316L.[70,71]

Eléments	C	Mn	Si	Cr	Ni	P	S	Mo	Fe
Composition (% massique)	<0,03	2,0	1,00	16,18	10-14	0,045	0,03	2-3	balance

Tableau 7 : Propriétés mécaniques de l'acier inoxydable 316L.[70,71]

Propriétés mécaniques	**Valeurs**
Module élastique	190 - 210 GPa
Résistance à la traction	460 - 860 MPa
Allongement à la rupture	< 60 %
Dureté (Brinell)	160 - 190
Densité	7,96 $g.cm^{-3}$

2.1.2. Les surfaces fluorocarbonées

Polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Le PTFE est depuis longtemps utilisé pour plusieurs applications biomédicales. Comme vu précédemment, c'est encore de nos jours un des matériaux les plus utilisés dans la fabrication d'implants et de prothèses vasculaires, du fait de ces multiples propriétés, à savoir :

- il possède de bonnes propriétés mécaniques pour les applications endovasculaires,
- il est chimiquement inerte,
- il possède une faible énergie de surface qui permet de limiter l'adhérence des cellules et des protéines et donc réduit ses propriétés thrombogéniques, entre autres.

Le polymère fluorocarboné déposé par plasma (CF_x)

Afin de transférer ces propriétés aux stents métalliques, la recherche c'est portée sur le dépôt par plasma de polymères fluorocarbonés imitant la structure du PTFE (Figure 8). La modification par plasma permet alors de modifier les propriétés de surface de l'acier tout en conservant ses propriétés de volume. Pour ce faire, un film de CF_x est déposé et polymérisé par un plasma radiofréquence sur des échantillons plats d'acier inoxydable 316L à partir d'un mélange de gaz C_2F_6/H_2. Avant d'être recouverts, les échantillons d'acier sont prétraités par nettoyage, électropolissage et décapage à l'hydrogène, ce qui permet de réduire, d'uniformiser et d'activer la couche d'oxyde en vue de la polymérisation du film de CF_x.[72] Le film obtenu mesure 30-40 nm d'épaisseur et présente alors plusieurs avantages :

- il offre une protection au métal contre la corrosion,
- il présente une bonne cohésion et une forte adhérence au substrat métallique,
- une bonne résistance à la déformation,[73]
- une bonne stabilité dans l'eau et en milieu pseudo-physiologique,[74,75]
- facilite la fonctionnalisation d'un matériau en acier.

Les deux surfaces fluorocarbonées offrent alors une surface inerte, possédant des propriétés mécaniques, avantageuse pour le greffage de biomolécules. Dans le cadre du projet, les surfaces sont modifiées avec du dextrane. Afin de créer des liens covalents entre le polysaccharide et la surface, il est nécessaire de la fonctionnaliser.

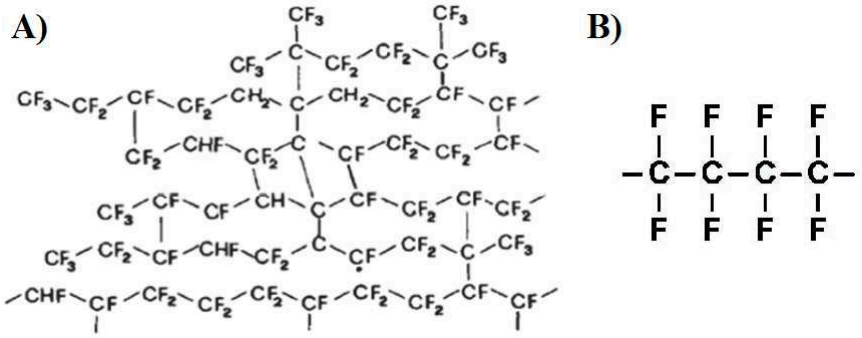


Figure 8 : Structures chimiques du CF_x[76] et du PTFE.

2.1.3. L'amination par plasma

Dans ce projet, le dextrane a été greffé de façon covalente sur deux substrats fluorocarbonés : des films de PTFE et des surfaces d'acier-CF_x. Pour former des liaisons covalentes, il faut créer des groupements actifs à la fois sur le polysaccharide et sur le substrat. Plusieurs « couples » de groupements réactifs sont possibles et la stratégie choisie a été d'utiliser des fonctions amines, fortement réactives vis-à-vis des fonctions aldéhydes ou

carboxyliques. Dans le cadre de l'utilisation d'amine, le substrat peut être fonctionnalisé selon deux voies principales :

- par dépôt d'une couche fonctionnelle à la surface en immergeant le substrat dans une solution de polymère aminé (amino-silane, dopamine)[77–79]
- par modification de la surface du substrat par plasma, soit en y introduisant directement des fonctions amines, soit en déposant une couche de polyamine ou polyaldéhyde polymérisés dans le réacteur.[80–82]

Pour ce travail, nous avons choisi de fonctionnaliser la surface des substrats en y introduisant directement des groupements amines. La modification par plasma permet de ne pas modifier les propriétés de volume des substrats, d'une part. D'autre part, le fait d'avoir des amines directement à la surface du substrat évite, lors du greffage du dextrane, l'influence possible d'une autre couche de polymère sur les propriétés de l'échantillon. Les amines ont été introduites par un plasma micro-onde continu à partir d'un mélange de gaz H_2/N_2 (20/80 sccm). L'amination a été optimisée afin d'obtenir le maximum d'amines à la surface sans altérer les surfaces fluorocarbonées.[83] Lors de la fonctionnalisation par plasma plusieurs espèces azotées sont introduites à la surface des échantillons (Figure 9). Afin de différencier les amines primaires des autres groupements azotés, une dérivation chimique a été effectuée, faisant réagir une molécule, le chlorobenzaldéhyde, de façon spécifique avec les amines.[84] Le chlore n'appartient ni à la structure de la surface de l'échantillon ni aux gaz utilisés dans le plasma et permet la quantification des amines après analyse de la composition chimique se surface de l'échantillon. En moyenne, 2-3 % d'amines sont obtenus ce qui équivaut à 0,5-2 molécules d'amines par nm²,[85] quantité largement suffisante pour greffer du dextrane de 70 kDa.

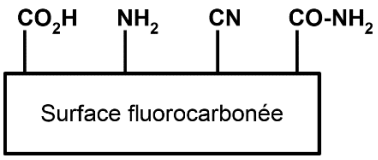


Figure 9 : Fonctionnalisation par plasma de surfaces fluorocarbonées, introduisant à la surface des amines primaires ainsi que d'autres espèces.[84]

2.2. Les polymères et leurs synthèses

Dans ce travail, le dextrane a été utilisé sous deux formes :

- Sous forme de **chaînes greffées** à des surfaces aminées. Des modifications ont été alors nécessaires afin d'introduire sur la chaîne de dextrane des groupements pouvant réagir avec les amines des substrats.

- Sous forme de **film de copolymère**. Un dextrane modifié a été associé à un polymère synthétique (polyacrylate). Le dextrane étant non filmogène, la copolymérisation avec un polymère synthétique

permet alors de former des films à partir de dextrane et, qui plus est, avec une bonne résistance à la déformation. Outre les propriétés mécaniques, le polyacrylate apporte aussi des propriétés biologiques au copolymère.

Les parties suivantes décrivent les propriétés de ces différents polymères et copolymères ainsi que les synthèses et les méthodes de fabrications des revêtements.

2.2.1. Les polysaccharides

Le dextrane

Les polysaccharides sont des polymères naturels de la famille des glucides. Ce sont des chaînes de plus de dix unités monosaccharides reliées entre elles par des liaisons glycosidiques O-C-O. Ces dernières années, la recherche s'est intéressée aux polysaccharides en tant que revêtement de prothèses vasculaires contre l'adhérence des protéines et contre la thrombose.[81,86,87] Le dextrane est un polysaccharide biocompatible produit par différentes souches bactériennes et qui est utilisé dans de multiples domaines tels que l'alimentaire ou le médical.[88] La souche Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512, utilisée pour ce projet, produit un dextrane facilement hydrolysable, d'une faible antigénicité et d'une haute solubilité dans l'eau qui le rend particulièrement intéressant pour les applications médicales et techniques. Il s'agit d'un polymère linéaire, amorphe, neutre, hautement hydrophile constitué d'unités glucosidiques reliées entre elles majoritairement par des liaisons α (1→ 6) qui se comportent comme des « rotules » et confèrent aux chaînes une grande flexibilité.[89,90] Ces liaisons permettent au dextrane d'être soluble dans une grande variété de solvants.[91] Le dextrane est fortement utilisé dans le domaine vasculaire comme substitut du plasma sanguin ainsi que pour la prévention et le traitement de thromboses ou encore pour améliorer la tenue de prothèses.[92]

Tableau 8 : Quelques exemples de propriétés biologiques du dextrane et de certains de ses dérivés (oxydé, carboxyméthylé, sulfaté).

Dextrane et dérivés	Forme	Propriétés	Références
Dextrane Dx. Carboxyméthylé	Solution	Expansion de volume Substitut de plasma sanguin	92–94
Dextrane Dx. Sulfaté	Solution	Anti-thrombogène Anticoagulant Antiplaquettaire	92,93,95–97
Dextrane	Solution	Non-antigénique Non-immunogène	89,98
Dx. Sulfaté	Solution	Favorise la croissance des cellules endothéliales Inhibe la croissance des cellules musculaires lisses	99,100
Dx. Sulfaté	Solution	Anti-inflammatoire	95
Dx. Oxydé Dx. Carboxyméthylé Dx. Sulfaté	Greffage	Anti-adhérence : - protéines - cellules mammifères (fibroblastes, épithéliales, etc.) - bactéries (S. Aureus, E. Coli)	101,102 52,103,104 95

D'un point de vue chimique, la présence de nombreux groupements hydroxyles permet d'y faire facilement réagir d'autres molécules donnant accès à de nouvelles structures et apportant de nouvelles propriétés au dextrane. Via des réactions chimiques simples, la chaîne de dextrane peut être fonctionnalisée avec des groupements chimiques qui permettent ensuite d'améliorer les propriétés biologiques du dextrane ou d'en créer de nouvelles (Tableau 8). Le champ de modification du dextrane est très large et ces modifications peuvent s'additionner entre elles conduisant à la formation d'un très grand nombre de matériaux. Elles sont particulièrement intéressantes pour transférer les propriétés biologiques du dextrane sous d'autres formes comme des hydrogels et des revêtements de surface ou encore pour coupler ces propriétés à celles d'autres polymères (Figure 10).

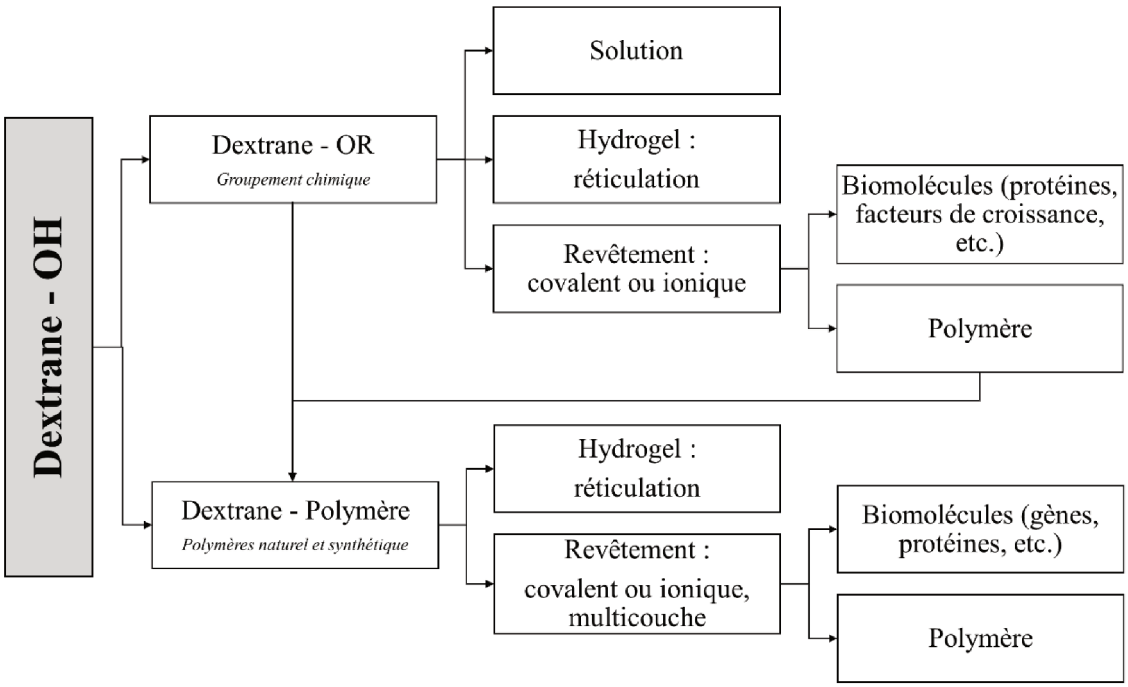


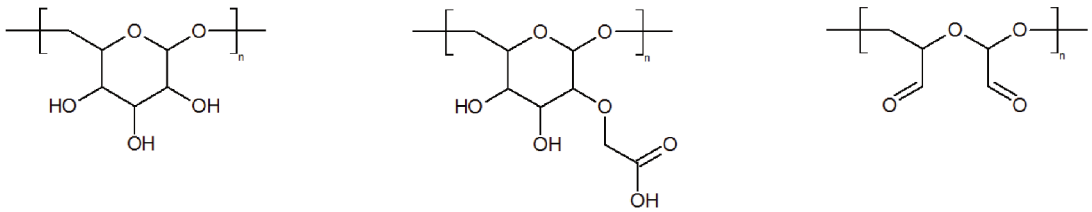
Figure 10 : Exemple de modifications possibles du dextrane permettant d'obtenir de nouveaux matériaux de par leurs propriétés et leurs mises en forme. L'introduction de groupements chimiques (COOH, HCO, etc.) sur la chaîne de dextrane permet d'obtenir des hydrogels[105] après réticulation, de le greffer à d'autres polymères, d'améliorer ses propriétés en solution[106] ou encore de recouvrir des surfaces via des liens covalents ou ioniques.[52,107] Le dextrane natif peut aussi directement être modifié avec d'autres polymères, aboutissant sur d'autres types d'hydrogels[108–110] et de revêtements. Le plus souvent, il s'agit de revêtements composés de plusieurs couches de différents polymères liés entre eux par des liens ioniques ou covalents. Dans les deux cas, les revêtements peuvent par la suite être couplés à des biomolécules[111–114] ou d'autres polymères, afin de moduler les propriétés biologiques.

L'OxD et le CMD : greffage du dextrane sur les surfaces aminées

Afin de pouvoir greffer le dextrane aux surfaces aminées, deux voies de modifications ont été envisagées : la réaction de carboxyméthylation et l'oxydation au périodate de sodium.

L'oxydation au périodate ouvre le cycle des unités glucosidiques pour former un hémiacétal/aldéhyde (Figure 11) ou de l'acide formique lorsqu'il y a double oxydation du cycle.[80] L'excès de périodate est par la suite désactivé par ajout d'éthylène glycol.[115] De plus, à cause de la photo-dégradation du périodate et la faible stabilité des hémiacétals, toute la synthèse doit être effectuée à l'abri de la lumière. Le greffage de dextrane oxydé ne nécessite aucun catalyseur et se fait en milieu aqueux. Les liaisons formées (imines) sont instables et peuvent se dissocier à nouveau, elles sont donc stabilisées par réduction sous l'action de cyanoborohydrure de sodium ($NaBH_3CN$).

La réaction de carboxyméthylation, s'effectue en milieu fortement basique, où l'acide monochloroacétique (MCA) permet de substituer les hydroxyles des unités glucosidiques par des groupes carboxyméthyles (CH_2-COOH) avec libération d'un proton et d'un ion chlorure.[52] La réaction entre le CMD (Figure 11) et les amines se fait en présence de catalyseurs. Les deux types les plus utilisés dans la littérature sont le N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)[106,116] et les carbodiimides.[117] Pour ce projet, la chimie des carbodiimides a été utilisée pour des raisons de facilité de manipulation et parce qu'elle est mieux référencée (chapitre **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Le greffage s'effectue par réaction des COOH et des NH_2 avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS). Les groupements acides carboxyliques (COOH) sont alors activés par l'EDC pour former un anhydride intermédiaire (o-acylisouré) qui est ensuite stabilisé par NHS pour former une liaison amide avec les amines présentes à la surface (annexe 8.1).[62,109,113,118]

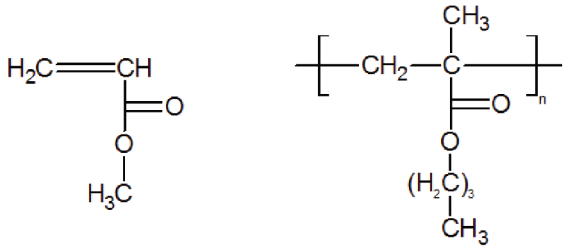


Dextrane CMD OxD

Figure 11 : Structures du dextrane et de ses dérivés carboxyméthylés (CMD), et oxydés (OxD). La structure représente une unité de CMD monosubstituée (un seul CM). Lors des synthèses de CMD et OxD toutes les unités saccharidiques ne sont pas forcément modifiées.

2.2.2. Les polyacrylates

Les polyacrylates sont synthétisés par la polymérisation des monomères acrylates via l'ouverture de la liaison C=C (Figure 12). Ces polymères offrent une bonne tenue mécanique, mais aussi des propriétés biologiques. Des études ont été effectuées sur des stents recouverts de polyacrylates dans le but de réduire la réponse de la paroi vasculaire. Par exemple, un stent recouvert d'un copolymère poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle)-co-poly(méthacrylate de méthyle) (PHEMA-PMMA) a montré une baisse de l'épaississement intimal ainsi qu'une intégrité du revêtement après extension du stent.[119] De plus, des revêtements de poly(méthacrylate de butyle) (PBMA) déposés sur des stents ont permis de favoriser les cellules endothéliales (dépôt par plasma)[120] et de mener à l'apoptose des cellules musculaires lisses (dépôt par trempage).[121] Le PBMA est déjà commercialisé sous forme de revêtement de stent : le sent CYPHER® possède un recouvrement de poly(éthylène-acétate de vinyle) (PEVA) et de PBMA pour la diffusion de principes actifs.[65,122] Toutefois, les polyacrylates hydrophobes, tels que le PMMA et le PBMA, sont connus pour être inertes biologiquement. Il faut alors considérer que les résultats obtenus pour les revêtements de PHEMA-PMMA et PBMA (déposé par plasma), ne sont pas dus uniquement aux propriétés des PMMA et PBMA mais aussi aux propriétés hydrophiles qu'offrent le PHEMA dans un cas et les groupements hydroxyles introduits par plasma dans l'autre cas. L'association d'un polysaccharide à un polyacrylate permettrait alors d'obtenir cette partie hydrophile, mais aussi de coupler les propriétés biologiques des deux polymères, voire d'en produire de nouvelles.



Acrylate PBMA

Figure 12 : Structures du groupement acrylate et du poly(méthacrylate de butyle) (PBMA).

2.2.3. Les copolymères polysaccharides-polyacrylates

2.2.3.1. Les associations polysaccharides-acrylates

Le caractère hydrophobe-hydrophile d'un polymère lui offre des propriétés de surfaces intéressantes et une utilisation en tant que tensioactif ou agent compatibilisant. Par exemple, la présence d'eau à la surface d'un biomatériau abaisse la tension interfaciale avec le sang ce qui peut réduire l'adsorption de protéines

(fibrinogènes) responsables des premières phases de formation du thrombus et ainsi permettre une meilleure endothélialisation.[123] Considérant cela, un polymère amphiphile peut offrir une surface faiblement thrombogène et biocompatible. Ces différents aspects ont intéressé les chercheurs qui ont étudié l'association de polysaccharides et d'acrylates pour de multiples applications (Tableau 9).

Tableau 9 : Exemple d'association entre les polysaccharides et les acrylates/polyacrylates et leur application.

Polysaccharide-acrylate	Forme	Application visée	Référence
Dextrane-GMA Hyaluronan-GMA	Hydrogel	Ingénierie tissulaire	124,125
Dextrane-MAAH	Hydrogel	Biomédical	110
Alginate-PAEMA	Film	ND	126
Héparine-PMMA	Suspension	Surface anticoagulante	127
Cellulose-PDMAEMA	Suspension	Biomatériaux	128
Amidon-PMA	ND	Médical, emballage alimentaire	129
Chitosane-GMA-PMMA	Brute	Remplissage dentaire	130

GMA : méthacrylate de glycidyle ; PAEMA : poly(méthacrylate de 2-aminoéthyle) ; PMMA : poly(méthacrylate de méthyle) ; PDMAEMA : poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl méthacrylate) ; PMA : poly(acrylate de méthyle) ; MAAH : anhydride méthacrylique ; ND : non-déterminé.

Tableau 10 : Propriétés apportées par le polyacrylate et le polysaccharide au sein du copolymère et leur intérêt versus les applications possibles.

Polyacrylate	Polysaccharide	Intérêt possible
Hydrophobe Tension de surface plus forte	Hydrophile	Favoriser la ré-endothélialisation. Les cellules adhèrent difficilement sur des surfaces trop hydrophiles ou trop hydrophobes.
Filmogène	Non-filmogène	Former des revêtements, des surfaces polymériques, résistantes en milieu aqueux.
Rigide et fragile (résistant mais cassant)	Souple (chaînes flexibles mais non-cohésives)	Augmenter la résistance à la déformation.
Inerte, favorise l'adhérence des EC et limite celle des CML (PBMA)	Hémocompatible, favorise la croissance des EC et limite celle des CML (dextrane et dérivés)	Limiter l'hyperplasie Limiter les réactions inflammatoires

D'une part, l'association polysaccharides-acrylates a été étudiée pour la fabrication d'hydrogels par réticulation via les liaisons C=C des fonctions acrylates. Dans ce cas, l'acrylate possède un autre groupement qui permet sa réaction avec le polysaccharide comme l'oxyde d'éthylène pour le méthacrylate de glycidyle ou l'anhydride pour l'anhydride méthacrylique (Tableau 9). D'autre part, des copolymères ont été synthétisés à partir de polysaccharides incluant des polymères d'acrylates. Dans ce cas, les polyacrylates sont majoritairement polymérisés à partir des monomères via la liaison C=C directement sur la chaine polysaccharidique. La copolymérisation de polysaccharides et de polyacrylates permet la formation de meilleurs biomatériaux en

associant leurs propriétés complémentaires dont les plus pertinentes pour ce projet sont décrites dans le Tableau 10.

2.2.3.2. Les voies de copolymérisation

Outre les copolymères polysaccharides-polyacrylates, il existe aussi dans la littérature des copolymères composés de différents polymères synthétiques les polyacrylamides ou polyacrylonitriles.[131] Ces copolymères ont été synthétisés utilisant le même principe : la formation de radicaux qui par propagation forment le polymère dit « greffé » au polysaccharide à partir des monomères synthétiques. Il existe plusieurs types de polymérisations radicalaires qui se différencient principalement par la réaction de formation des radicaux :

La polymérisation radicalaire contrôlée

Elle utilise le principe de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (en anglais Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP). La formation des radicaux s'effectue à l'aide d'un catalyseur qui est un complexe métallique de transition et un initiateur qui est un hydrocarbure halogéné. Le catalyseur est composé du complexe métal-halogène et de son ligand. La copolymérisation comprend deux réactions : 1) la formation de l'initiateur à partir du polysaccharide 2) la réaction d'ATRP en elle-même (initiation et propagation des radicaux). Le catalyseur réagit avec l'initiateur pour former les radicaux qui par propagation vont former les chaînes de polymères en croissance. Il fournit alors un équilibre entre une forme active, propageante, du copolymère et une forme inactive, dormante. La forme dormante du copolymère est favorisée dans cette réaction et évite les réactions secondaires. Le contrôle de la réaction est alors atteint par la diminution de la concentration de radicaux dans le milieu et il n'y a pas d'étape de terminaison. Elle permet alors un bon contrôle du nombre et de la longueur des chaînes du polymère greffé.[128,132]

La polymérisation radicalaire libre

La formation de radicaux s'effectue par une réaction redox entre un oxydant métallique comme Ce(IV), Mn(III), Cu(II) ou Fe(III) et le polysaccharide. L'initiation se fait par l'attaque de l'oxydant formant des radicaux libres sur la chaîne de polysaccharide qui réagissent avec les monomères et forme le polymère greffé par propagation. Au contraire de l'ATRP, cette voie de polymérisation possède une étape de terminaison où les radicaux sont désactivés par recombinaison. Cette voie de polymérisation est connue pour former une grande quantité d'homopolymère en réaction secondaire.

Même si la copolymérisation via l'ATRP offre un meilleur contrôle des chaînes greffées, elle s'effectue souvent en milieu organique avec des solvants toxiques (DMSO, Toluène, DMF, etc.) et nécessite l'utilisation d'halogènes, aussi toxiques. Cela implique de plus un lavage conséquent du copolymère par la suite afin de le purifier. Au contraire, la polymérisation radicalaire libre s'effectue en milieux aqueux et même si son rendement est faible due à la forte production d'homopolymère, elle est aussi plus facile à faire techniquement et ne

nécessite pas d'étape de synthèse d'initiateur. De plus, plusieurs copolymères ont été synthétisés à partir de Ce(IV)[133] montrant des propriétés anticoagulantes comme l'héparine-PMMA[127] ou des structures pour la diffusion de principes actifs comme le dextrane-isopropylacrylamide,[134] intéressantes pour l'application aux dispositifs médicaux liés au vasculaire. La voie de la copolymérisation radicalaire a été choisie dans ce projet pour former des copolymères de dextrane carboxyméthylé et poly(méthacrylate de butyle).

2.3. Caractérisation des matériaux et leurs propriétés

La caractérisation physico-chimique des polymères est importante, surtout dans le cadre de procédés à étapes multiples comprenant plusieurs modifications successives. Une connaissance approfondie de la composition des polymères synthétisés permet à la fois :

- d'élaborer les réactions suivantes qu'il s'agisse du greffage du dextrane ou de la copolymérisation.
- de comprendre les mécanismes de synthèse.
- de prédire et de comprendre les interactions polymères-composants biologiques.
- de prédire et comprendre leur comportement mécanique.

Il important par la suite, pour des applications biomédicales, d'étudier les réponses biologiques et mécaniques des matériaux. Cela permet d'évaluer le comportement des surfaces vis-à-vis de composants biologiques comme les cellules ou le sang et de déterminer leur stabilité face aux contraintes mécaniques imposées par le déploiement du stent, la manipulation du dispositif ou encore le flux sanguin.

Pour ce projet, les polymères ont été analysés sous forme brute (poudre) et sous forme de surfaces (revêtement de dextrane greffé et film de copolymère), mettant en jeu différentes techniques d'analyse.

2.3.1. Les polymères et les surfaces de polymères

La composition chimique des polymères peut-être déterminée à partir de différentes techniques basées sur différents principes comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou la résonnance magnétique nucléaire (RMN). La spectroscopie FTIR se fait par absorbance, à travers une pastille de polymère mélangé à du KBr, ainsi que directement sur le polymère brut ou une surface/substrat par réflectance totale atténuée (ATR, de l'anglais attenuated total reflectance). Il est possible aussi d'analyser la composition chimique d'une poudre de polymère par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS, de l'anglais X-ray photoelectron spectroscopy) bien que cette technique soit privilégiée pour l'analyse de surfaces (films de polymères). Le degré d'hydrophobicité d'une surface, qui est lié entre autre à sa composition chimique, peut être quant à lui analysé par angle de contact.

Tableau 11 : Techniques de caractérisation.[135]

	Technique	Principe et informations obtenues
Polymère brut	FTIR	Permet de voir les vibrations des atomes les uns par rapport aux autres, vibrations dépendantes du type de liaisons chimiques. En ATR, profondeur d'analyse environ 1 µm. Qualitative, cette technique permet de rapidement vérifier les modifications du dextrane avec l'apparition de la bande C=O.
	RMN	Mesure la fréquence de résonnance des noyaux lorsque soumis à un champ magnétique. Cette fréquence varie suivant l'environnement chimique de l'atome considéré, tel que le ^{1}H et le ^{13}C.Elle peut s'effectuer à l'état liquide où le polymère est dissout dans un solvant deutéré ou à l'état solide. Mesure quantitative en RMN du ^{1}H et qualitative pour ^{13}C, cette technique permet de vérifier la modification du dextrane, de quantifier le degré de substitution et de valider l'efficacité de la copolymérisation à l'état solide.
	CES	Technique de chromatographie en phase liquide qui permet de séparer des macromolécules en fonction de leur taille hydrodynamique, détection faite par diffusion de la lumière. Cette diffusion est dépendante de la masse moléculaire moyenne des chaines de polymère. Cette technique permet de déterminer la masse moléculaire en nombre et en poids des copolymères obtenus.
	Viscosimètre	Mesure la viscosité intrinsèque d'une solution de polymère et permet de déterminer la masse moléculaire viscosimétrique.
	DSC	Mesure calorimétrique basé sur un échange d'une quantité de chaleur entre un échantillon et une référence afin de les garder à la même température, dû à un changement physique de l'échantillon, comme une transition vitreuse d'un polymère à une température Tg. Cette technique peut donner des indices quant à la structure du copolymère, par exemple 2 Tg distinctes = copolymère en bloc.
	TGA	Mesure la perte de masse d'un polymère lors de sa dégradation par augmentation de la température. Cette technique permettrait de déterminer la quantité massique de chaque polymère dans un copolymère.
Surface	XPS	Technique basée sur l'énergie cinétique des photoélectrons émis lorsque la surface est soumise à un bombardement de rayon X. L'énergie cinétique est directement corrélée à un élément atomique et est aussi influencer par l'environnement chimique de ce dernier. La profondeur d'analyse est de ~ 5 nm. Elle permet de déterminer la composition atomique de la surface du matériau, en survol, et le type de liaisons en présence (ex. C1s, O1s), en haute résolution.
	Angle de contact	Par le dépôt d'une goutte d'eau, permet d'évaluer la mouillabilité d'une surface et donc son degré d'hydrophobicité.
	AFM	Analyse topographique de la surface sur 1-10 Å de profondeur grâce à une pointe très fine. Cette technique permettrait de mesurer la rugosité des films.
	MEB	Analyse topographique de la surface sur environ 1 µm de profondeur, en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Cette analyse permettrait de voir l'homogénéité des films ainsi qu'analyser l'adhérence de cellules sur une surface.

La masse moléculaire moyenne d'un polymère peut-être mesurée à partir d'analyses en chromatographie d'exclusion stérique (CES) et en viscosimétrie. La CES sépare les chaînes de polymère selon leur taille et associée à un détecteur de diffusion de lumière, comme le MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering) et à un réfractomètre différentiel, permet mesurer les masses moléculaires moyennes en poids et en nombre du polymère. Une autre façon de mesurer la masse moléculaire d'un polymère est par viscosimétrie. Un viscosimètre d'Ubbelohde, par exemple, permet de mesurer la viscosité intrinsèque de la solution de polymère et de calculer la masse moléculaire visqueuse par la relation de Mark-Houwink.

Pour des copolymères la calorimétrie différentielle à balayage (DSC, de l'anglais differential scanning calorimetry) et l'analyse thermogravimétrique (TGA, de l'anglais thermogravimetric analysis) permettre d'étudier la structure et la composition du copolymère versus les polymères le composant.

La topographie des surfaces/substrats peut être analysée par microscopie à force atomique (AFM, de l'anglais, atomic force miscroscopy) et par microscopie à balayage (MEB). Dans le cas de polymère, les surfaces nécessitent d'être recouverte d'un revêtement conducteur avant de pouvoir être analysées par MEB. Le Tableau 11 résume ces quelques techniques de caractérisation et les données qui en découlent.

2.3.2. Résistance mécanique des polymères

Lorsqu'il s'agit d'applications biomédicales, il est important de vérifier les propriétés mécaniques des matériaux concernés. Que ce soit pour une application aux stents, ou pour une application aux prothèses synthétiques ou encore aux cathéters, le matériau doit montrer une certaine flexibilité et souplesse (Figure 13). En effet, de par leur manipulation à travers le réseau sanguin et leur fonction propre, ces dispositifs sont souvent courbés. Les matériaux du volume ainsi que les revêtements doivent donc pouvoir résister à ces déformations. De plus, dans le cas des stents, un problème récurrent est le délaminage du revêtement polymérique suite à l'expansion du stent dû à des propriétés mécaniques et une adhérence au substrat métallique insuffisante (Figure 13).

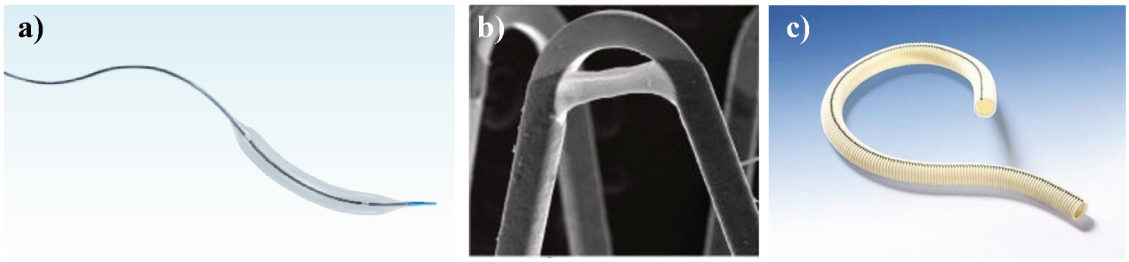


Figure 13 : Les polymères doivent montrer une certaine souplesse et résister à la déformation. a) Souplesse du cathéter Ryujin™[136] b) Délaminage du revêtement de PEVA/PBMA du stent CYPHER®[137] c) Flexibilité de la prothèse HEMAGUARD.[23]

Afin de pouvoir subir la déformation sans se fissurer, le polymère doit montrer une certaine élasticité en compression et en traction. Un essai simple de traction permet d'évaluer rapidement le pourcentage de déformation que peut subir un polymère avant de fracturer (Figure 14.b). On peut alors déterminer son allongement à la rupture.

Pour un matériau viscoélastique, comme une grande partie des polymères et particulièrement les copolymères dextrane-PBMA, un essai de relaxation de contraintes permet d'évaluer les propriétés élastiques et visqueuses du polymère. Il s'agit d'appliquer une déformation constante au polymère et d'observer la diminution de la contrainte en fonction du temps (Figure 14.c). A partir de courbes obtenues, des modèles rhéologiques (viscoélastiques) peuvent être déterminés et permettre ainsi d'évaluer les constantes élastiques et visqueuses du matériau.

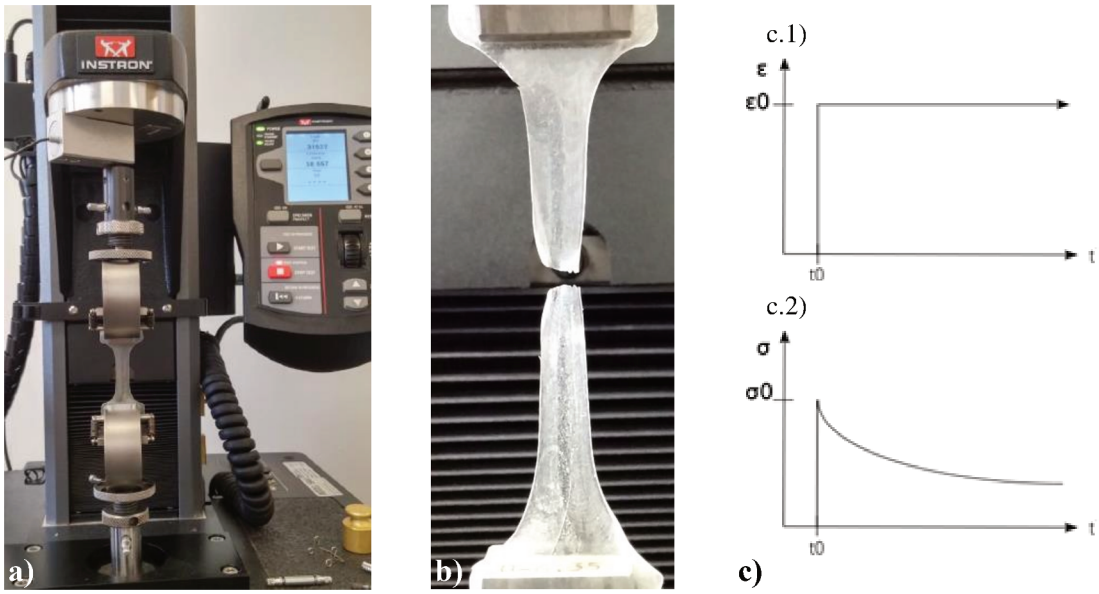


Figure 14 : Essai de traction et de relaxation sur éprouvette de copolymère CMD-PBMA. a) appareil de traction b) rupture c) relaxation des contraintes en fonction du temps (c.2) pour une déformation constante (c.1).

2.3.3. Performances biologiques

Hormis les propriétés mécaniques, il est essentiel d'étudier la réponse biologique des surfaces in vitro. Pour ce projet, les surfaces ont été étudiées versus leur hémocompatibilité et leur interaction avec les cellules.

Plusieurs tests existent afin d'évaluer l'hémocompatibilité des surfaces et peuvent se réunir en 2 groupes. Premièrement, certains tests étudient de l'interaction des composants du sang isolés avec les surfaces, comme l'adhérence des plaquettes. Deuxièmement, certains tests étudient l'interaction du sang complet avec les surfaces, en suivant la formation du caillot généralement.

Afin d'étudier la réponse cellulaire aux surfaces, plusieurs tests peuvent être effectués. Le plus souvent, les cellules sont mises en contact avec la surface et leur comportement est étudié en termes d'adhérence, de prolifération, de migration, d'activité métabolique, etc.

Le Tableau 12 rassemble quelques exemples de tests effectués pour étudier la réponse biologique des surfaces.

Tableau 12 : Analyses des performances biologiques in vitro[138–140]

Technique	Informations
Adhérence plaquettaire	Adhérence et activation des plaquettes sur la surface après avoir été en contact avec du plasma riche en plaquettes. Le plus souvent, les surfaces sont analysées par MEB qui permet de quantifier et d'observer les plaquettes activées.
Hémoglobine libre	Evalue la thrombogénicité de la surface en mesurant la quantité d'hémoglobine non-prise dans le thrombus après contact avec du sang complet pour un temps donné.
Cytotoxicité / Viabilité	Peut-être direct ou indirect. Le test direct revient à un test d'adhérence. De façon indirecte, les surfaces sont immergées dans du milieu qui est ensuite prélevé et utilisé pour cultiver des cellules. Dans les deux cas, l'activité métabolique est mesurée et permet de savoir si la surface a un effet toxique pour les cellules ou pas.
Adhérence cellulaire	Effectuée généralement dans les premières 24h de contact des cellules avec la surface. L'adhérence et l'étalement des cellules sont observés permettant alors de prédire leur comportement plus tardif et leur viabilité.
Prolifération cellulaire	Permet d'étudier la réponse cellulaire à plus long terme tel qu'à 1, 3 et 7 jours.
Migration cellulaire	Les cellules sont laissées à confluence puis une rayure est effectuée sur le tapis cellulaire. La migration des cellules pour combler cette rayure est observée.
Activité métabolique	Peut être mesurée par absorbance avec un test au MTT ou à la résazurine. Une cellule vivante va plus ou moins transformer ces composés, ce qui donne une indication sur leur activité métabolique et viabilité.

Afin d'approfondir les analyses du comportement cellulaire versus le biomatériau, des tests in vivo sur des modèles animaux puis des essais cliniques peuvent être effectués.

Dans ce travail, des tests évaluant la quantité d'hémoglobine libre ainsi que des tests d'adhérence de cellules endothéliales et musculaires lisses ont été effectués sur les surfaces de CMD greffés au PTFE, d'une part. D'autre part, des tests de cytotoxicité, adhérence et prolifération ont été effectués sur des films de copolymères avec des fibroblastes et des cellules endothéliales. De plus, des tests préliminaires avec des cellules musculaires lisses et des bactéries (S. Aureus et E. Coli) ont été faits sur les films de copolymères.

2.4. Stratégie et structure de la thèse

L'objectif initial de ce projet était d'obtenir un revêtement, à base de copolymère de dextrane-PBMA, pour des stents pouvant limiter l'hyperplasie néotinimale. Pour assurer une bonne adhérence du copolymère au substrat métallique et éviter le délaminage lors du déploiement du stent, la stratégie adoptée était de lier de façon covalente le copolymère à la surface du matériau. Pour ce faire, dans un premier temps, le substrat d'acier 316L

a été recouvert par plasma de CF_x et aminé. Dans un second temps, l'approche utilisée était de modifier le dextrane afin de former ultérieurement des liens covalents avec les amines de la surface, puis de synthétiser le copolymère à partir du dextrane modifié et enfin de greffer le copolymère lui-même au substrat. Bien que le greffage du copolymère ne fasse pas partie du travail présenté, toutes les étapes précédentes ont été optimisées et réalisées.

La méthodologie générale du projet et les parties effectuées sont présentées dans la Figure 15.

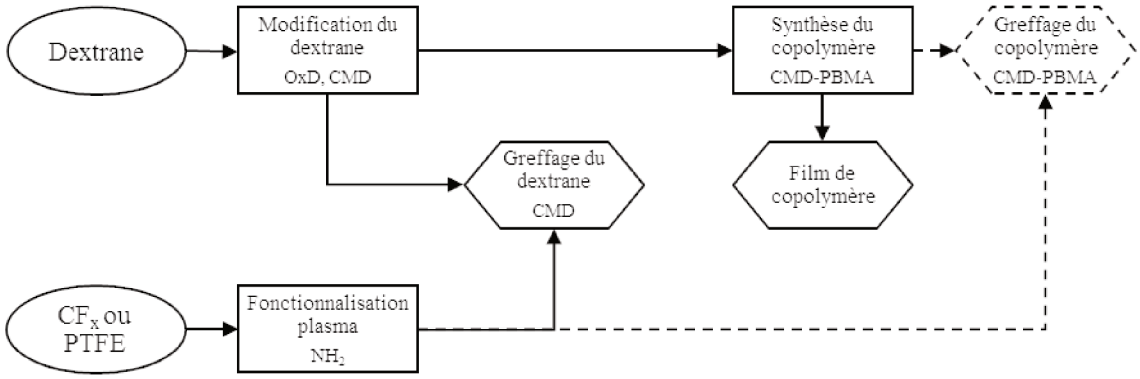


Figure 15 : Méthodologie générale du projet. Parties non-accomplies en pointillés.

La méthodologie proposée inclue :

- La synthèse de dérivés du dextrane sous forme de polymère (OxD et CMD) et de copolymère (CMD-PBMA),
- Le traitement de surfaces par plasma par dépôt (CFx) et par fonctionnalisation (NH_2),
- La confection de surfaces par greffage des polysaccharides dérivés du dextrane (OxD et CMD) et par formation de film de copolymères (CMD-PBMA).

Chaque étape de modification du dextrane a été analysée par certaines techniques vues dans le Chapitre 2.3 et constitue les trois parties du projet, qui sont fortement liées aux articles présentés.

Dans **la première partie**, plusieurs dextrane oxydé (OxD) et dextrane carboxyméthylé (CMD) ont été synthétisés, greffés et analysés afin de déterminer quelle modification serait la plus adéquate pour la suite du projet. Pour ce travail, le PTFE a été utilisé essentiellement dans le but d'optimiser le temps en évitant le processus d'étapes multiples du dépôt par plasma du CF_x. Après optimisation du greffage sur le PTFE, la meilleure condition de greffage a été utilisée pour chaque dextrane modifié sur des échantillons de CF_x.

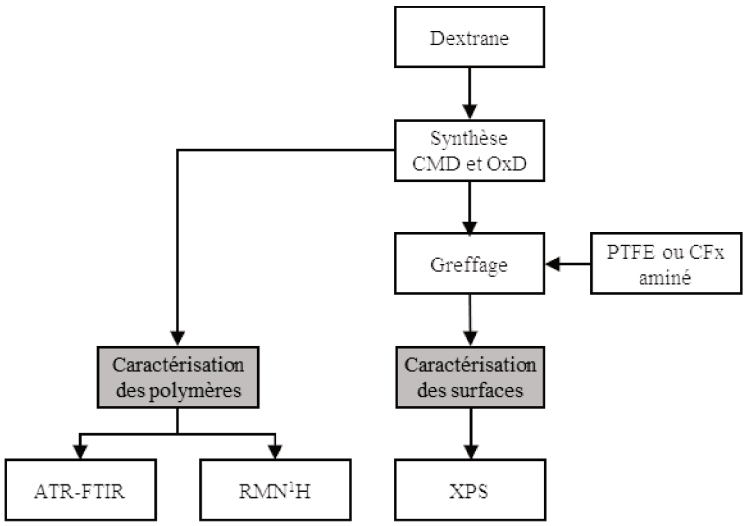


Figure 16 : Partie 1. Choix de la modification du dextrane dans l'idée du greffage ultérieur du copolymère.

Suite aux résultats obtenus, dans la **deuxième partie**, la synthèse et le greffage du CMD ont été optimisés. De même que pour la partie 1, l'optimisation du greffage a été effectuée sur des substrats de PTFE aminé. A cette étape du projet, nous voulions savoir quelle était la réponse biologique des revêtements de dextrane seuls avant de poursuivre avec le copolymère. Des tests ont donc été effectués sur des revêtements de CMD de différents degrés de substitution versus leur hémocompatibilité et l'adhérence des cellules endothéliales (EC) et musculaires lisses (CML).

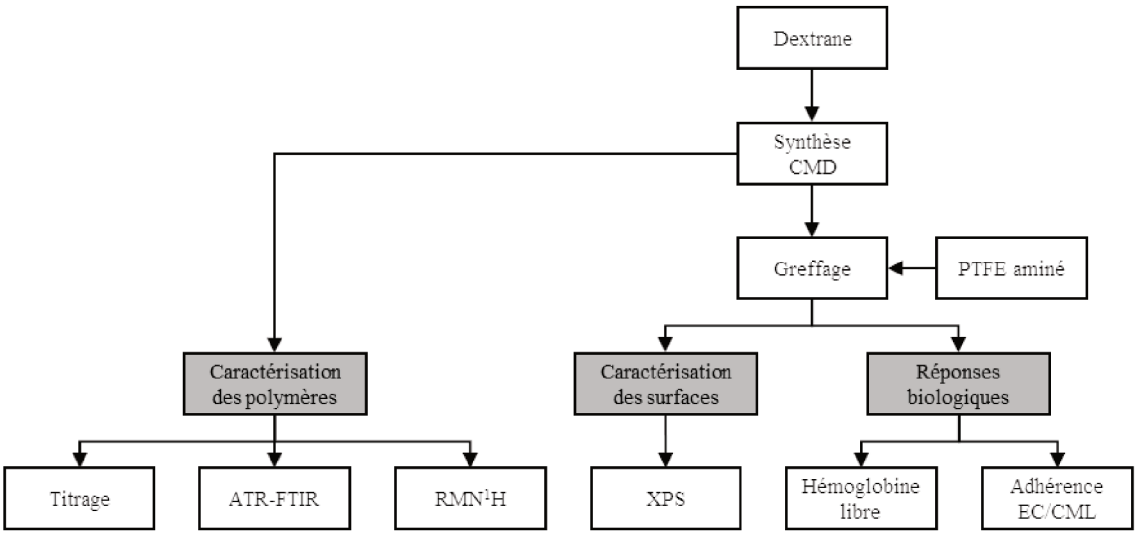


Figure 17 : Partie 2. Optimisation du greffage du dextrane carboxyméthylé (CMD) et réponse biologique des revêtements.

Enfin, dans la **troisième partie** des copolymères de CMD-PBMA ont été synthétisés. Les copolymères obtenus ainsi que leur synthèse ont été caractérisés. La solubilité des copolymères a été étudiée et des films ont été

produits. Avant de passer au revêtement de copolymère greffé, le comportement mécanique et biologique des films a été étudié versus des essais de traction et l'adhérence et la prolifération de fibroblastes 3T3 et de cellules endothéliales (EC). Des tests avec des cellules musculaires lisses ont aussi été effectués et figurent dans l'annexe 8.4.

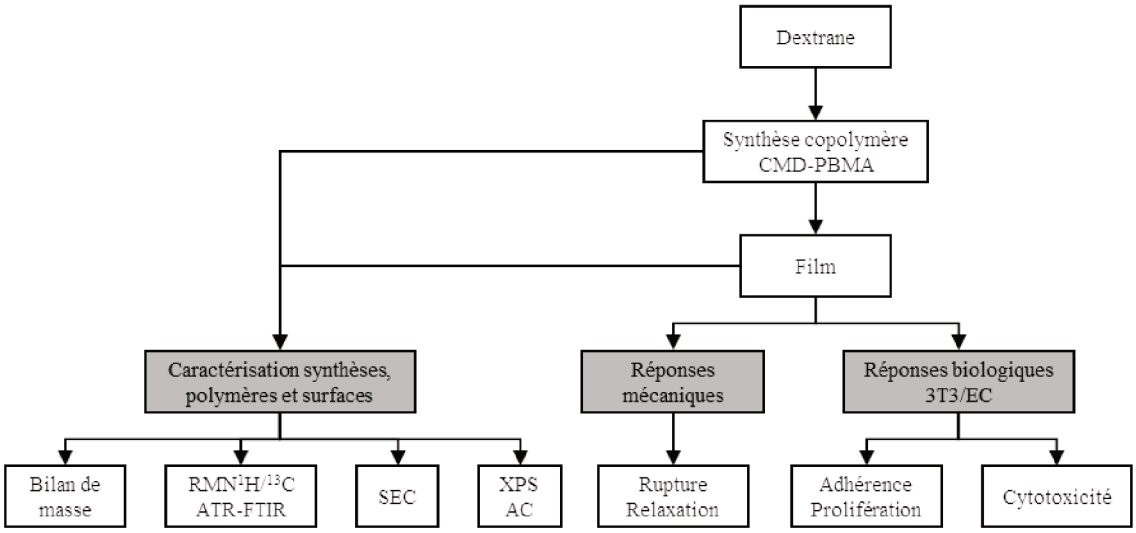


Figure 18 : Partie 3. Synthèse du copolymère de carboxyméthyldextrane (CMD) et poly(méthacrylate de butyle) (PBMA) et comportement mécanique et biologique de films de copolymères.

Les chapitres 3, 4 et 5 constituent des articles scientifiques et présentent les résultats des 3 parties montrées dans les Figure 16 , Figure 17 et Figure 18.

3. Polysaccharides grafting on fluorocarbon films deposited by plasma on 316L stainless steel for long term stable stent

Eléonore C. Michel[1,2], Pascale Chevallier[1], Amélie Barrère[2], Didier Letourneur[2] and Diego Mantovani[1]

[1]Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Department of Materials Engineering, Laval University & University Hospital Research Center, Quebec City, G1K 7P4, Canada

[2]INSERM, U698, Bio-ingénierie de Polymères Cardiovasculaires, CHU X. Bichat et Institut Galilée, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Keywords: polysaccharide, grafting, carboxymethyl dextran, oxidized dextran, fluorocarbon film

Ce chapitre a été publié dans Advanced Materials Research 409 (2011) 164-169

3.1. Résumé

Les stents intravasculaires sont des échafaudages métalliques qui permettent de rétablir le flux sanguin dans les vaisseaux obstrués. Toutefois, des cas de resténose intra-stent surviennent dans 30-40% des cas après 6 mois. Afin d'améliorer les performances cliniques de ces dispositifs à long terme, différents recouvrements sont utilisés. Cependant, la faible adhérence au substrat entraîne des délaminages des revêtements. C'est pourquoi l'approche considérée dans ce projet est de travailler d'une part sur un film fluorocarboné déposé par plasma, hautement adhérent au substrat métallique, et d'autre part avec un copolymère à base de dextrane et de poly(méthacrylate de butyle), possédant des propriétés biologiques et mécaniques intéressantes quant à l'application visée. L'approche est de greffer de façon covalente le copolymère à partir du dextrane sur le film fluorocarboné préalablement aminé. L'activation du dextrane a été réalisée par carboxyméthylation et par oxydation, puis suivie par FTIR et RMN. L'efficacité du greffage a été démontrée par XPS.

3.2. Abstract

Metallic intravascular stents are medical scaffolds commonly used to heal diseased arteries and to restore blood flow in vessels after a balloon angioplasty. Although clinical complications occurs (mainly in-stent-restenosis, representing 30-40 % of cases within six months after angioplasty), this clinical procedure reduces the risk of restenosis. In order to improve the long-term clinical performances of stents, different coatings, bioactives or not, are investigated and generally applied by dip-coating. However, the adhesion of the coating within the substrate is weak and delamination after stent deployment could be observed.

Therefore, our original approach was to consider a plasma fluorocarbon film deposit on stainless steel substrates, improving adhesion and providing protection against the stent corrosion, as a carrier for the subsequent grafting of a bioactive polysaccharide (dextran). Indeed, a copolymer made of dextran and metacrylate has already demonstrated interesting results toward cell proliferation and good mechanical properties regarding stent deployment. Hence, the final aim of this project is to covalently graft the copolymer of dextran-methacrylate to plasma-aminated fluorocarbon film. In this study, dextrans were functionalized in order to conjugate them to amino groups. Two different ways of functionalization were investigated: by carboxylmethylation reaction and by periodate oxidation. Characterizations were performed by FTIR, for organic syntheses and by XPS for the subsequent grafting on the surface. Coatings topography as well as stability were also investigated. Preliminary results suggest the use of polysaccharides grafted by plasma on fluorocarbon films to provide a stable stent surface.

3.3. Introduction

Stents are mesh wire tubes used to scaffold diseased arteries in order to re-establish the flood flow. Most commonly made of 316L stainless steel,[27] stents reduce significantly the risks of restenosis despite clinical complications remain (mostly in-stent-restenosis) with the rate of 30-40 % failures after six months of implantation.[46] Furthermore, studies on stents stability show that metallic stents could be corroded after a long-term implantation and release potentially toxic metallic ion as nickel and chromium, in the patient bloodstream.[24] In order to improve the long-term safety of the device, different coatings, bioactives or not, are investigated and generally applied by dip-coating regarding polymer coatings.[24,27,45,46] However, the adhesion of the coating with the substrate is weak and delamination after stent deployment could be observed.[73]

The final aim of this study is to perform a new bioactive covalent coating made from a polysaccharide and an acrylic monomer copolymerization, in order to provide a long-term stable stent. Indeed, dextran-methacrylate copolymer has already demonstrated interesting results toward cell proliferation and good mechanical properties regarding stent deployment.[141,142] To this end, the first step of our work was to consider the covalent grafting of dextran alone on 316L stainless steel substrates. Those substrates were first coated with a plasma polymerized PTFE-like film (CF_x), improving adhesion and providing protection against the stent corrosion,[143,144] and functionalized with amino groups.[84] Then, two approaches were investigated to modify dextran in order to covalently graft them to amino groups: carboxymethylation reaction and periodate oxidation provide carboxylic acid functions and aldehyde groups, respectively (Figure 19).

As CF_x film plasma deposition is a multiple step process, the optimization of the grafting processes have been done, in a first step on a similar surface, PTFE films, then applied on aminated CF_x-SS316L substrates. The different parameters investigated were two different degrees of substitution or oxidation respectively for carboxymethylated dextran (CMD) and oxidized dextran (OxD) at different concentrations. The different steps, dextran activation as well as surface amination and grafting were thoroughly characterized.

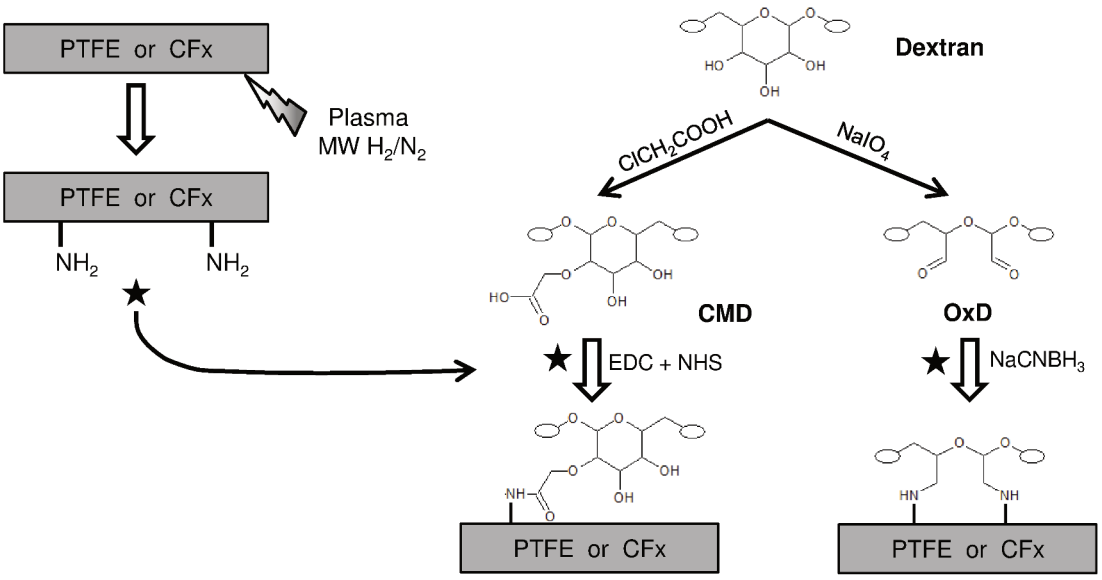


Figure 19 : Covalent grafting of carboxymethylated dextran (CMD) and periodate oxidized dextran (OxD) on aminated PTFE or aminated CF_x-SS316L.

3.4. Materials and Methods

3.4.1. Materials and sample preparations

Pieces of 3x1 cm were cut from 250 µm thick PTFE films (Goodfellow, England). PTFE samples were first cleaned in successive ultrasonic bath of acetone, deionised water and methanol for 10 min each and dried with dry particle-free compressed air. Disk-shaped substrates of 12.7 mm diameter and 0.5 mm thickness were punched from 316L stainless steel plates (Goodfellow, Devon, PA, USA). The substrate pre-treatment and the CF_x film deposition method have been previously described.[72] Briefly, the pre-treatment consists of the same ultrasonic cleaning phase as PTFE samples. A specific electropolishing process and a subsequent acid dipping were then performed. Successively, the sample was introduced in a plasma reactor for a continuous, in discharge, H_2 plasma etching at 100 W for 100 s. Pulsed, post-discharge, plasma polymerization was carried out in the same reactor with the following parameters: peak power input = 150 W; t_{on} = 5 ms ; t_{off} = 95 ms ; treatment time = 4 min. A mixture of 95 % C_2F_6 and 5% H_2 was used as feed gas. Then the amination step of CF_x films and PTFE was performed by plasma functionalization using in a downstream Microwave (MW) plasma reactor from Plasmionique Inc. (Varennes, QC, Canada), with high purity H_2 and N_2 gas (20 %, 80 %) at 300 W and 500 mTorr for 10 min.

3.4.2. Dextran activation

Dextran was purchased from Pharmacia Biotech (Orsay, France) with a molecular weight of 70 000 g/mol. Oxidized dextrans were synthesized by treating 2 g of dextran in water (100 mL) with 100 mL of sodium metaperiodate (Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) solutions, 15 mg/mL for 20 % of oxidation and 30 mg/mL for 40 % of oxidation,[80,115] for 20 h at room temperature, in the dark. Excess of periodate was desactivated by adding ethylene glycol and the pH neutralized. Then the polymer was precipitated in ethanol. OxD was recovered by filtration and dried under vacuum at 50 °C.

For the carboxymethylation reaction, 1 g of dextran was dissolved in 7.7 mL of 6 N NaOH previously cooled in an ice bath.[52,116] Then 1.46 g and 0.73 g of chloroacetic acid (Janssen Chimica, Noisy le Grand, France) respectively dissolved in 800 µL and 400 µL of water for 50 % and 25 % of substitution was introduced. The mixture was maintained at 60 °C for 60 min then cooled at room temperature and neutralized by addition of concentrated acetic acid. The polymer was then precipitated in methanol, recovered by filtration and dried under vacuum at 50 °C.

3.4.3. Surface immobilization

On one hand CMD was grafted, using water soluble carbodiimide chemistry (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC, and N-hydroxysuccinimide, NHS), to PTFE substrates following its surface amine functionalization. On the other hand, OxD was directly grafted on amino groups through the aldehyde functionalities leading to Schiff base which were further reduced in amines by sodium cyanoborohydride ($NaBH_3CN$). Briefly, the substrates were immersed in solutions of modified dextran (with EDC and NHS for CMDs) over a night under stirring. Then OxD grafted substrates were immersed in a $NaBH_3CN$ solution during 3h. All substrates were intensively rinsed with water 3 times under agitation. The concentrations used for those graftings (Table 13) are inspired from literature.[52,80,115,116] As the aldehyde functions are more reactive than the acid functions, the OxD solutions are therefore more diluted than CMD solutions. Samples with different concentrations of modified dextran were also investigated but the results will be not presented in this paper.

Table 13 : Concentration of modified dextran solutions and catalysts for aminated PTFE graftings.

Polymer	Grafting solution concentration (g/mL)	EDC (mg/mL)	NHS (mg/mL)	$NaBH_3CN$ (mg/mL)
CMD 25 %	0.30	19.2	11.5	-
CMD 50 %	0.30	19.2	11.5	-
OxD 20 %	0.05	-	-	3
OxD 40 %	0.05	-	-	3

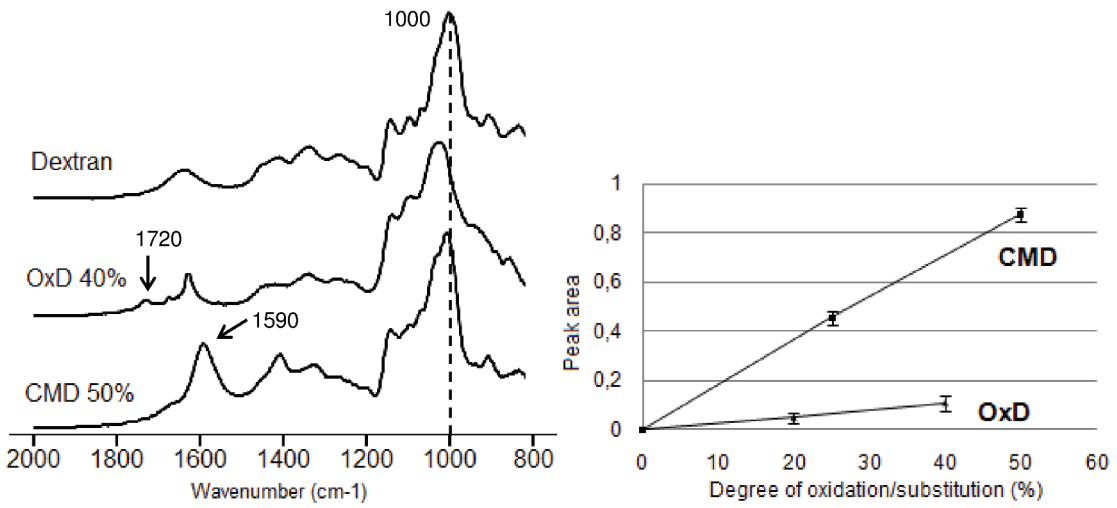
3.4.4. Modification characterization

The dextran modifications were evaluated by ATR-FTIR (attenuated Total Reflectance - Fourier-transform infrared spectroscopy) using a Nicolet Magna 550 (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. The maximum depth of analysis was estimated to be 1 µm and 100 scans were acquired at a spectral resolution of 4 cm^{-1}. The film surface composition was assessed using an X-Ray Photoelectron Spectrometer (XPS – PHI 5600-ci spectrometer – Physical Electronics USA, Chanhassen, MN, USA). Survey spectra were acquired at a detection angle of 45° using the Kα line of a standard aluminum X-ray source (1486.6 eV) operated at 300 W. Charge compensation was only required for PTFE film analyses for survey analyses whereas high resolution spectra were obtained with a standard Mg X-ray source (1253.6 eV) at 300 W with no charge neutralization.

3.5. Results and discussion

3.5.1. Polymer characterization

The activation of dextran through carboxymethylation or oxidation process was evaluated by ATR-FTIR spectroscopy (Figure 20). Indeed modified dextran spectra clearly exhibit the characteristic vibration band of carbonyl group from an aldehyde at 1720 cm^{-1}. For OxD and at 1590 cm^{-1} belongs to carboxylic acid salt (COO^-Na^+) for CMD. Furthermore, the intensity of these specific peaks could be directly correlated to the degree of dextran modification as shown in Figure 20.b, which were further confirmed by NMR^{1}H and acid-base titrations (data not shown). It should be also emphasized that the specific bands of dextran were also recovered in the CMD, leading to the conclusion that, even at a high degree of modification, the carboxymethylation procedure permit to keep the dextran main structure. Whereas it was not the case for the oxidation procedure which seemed to partially break glycosidic chains. Indeed the specific bands of dextran were slightly shifted to higher wavenumber: from 1000 cm^{-1} for dextran to 1022 cm^{-1} for OxD.



a) b)

Figure 20: Characterization of modified dextran a) ATR-FTIR spectra and b) correlation between the peak's area of the carbonyl vibration with the degree of modification.

3.5.2. Grafting characterization

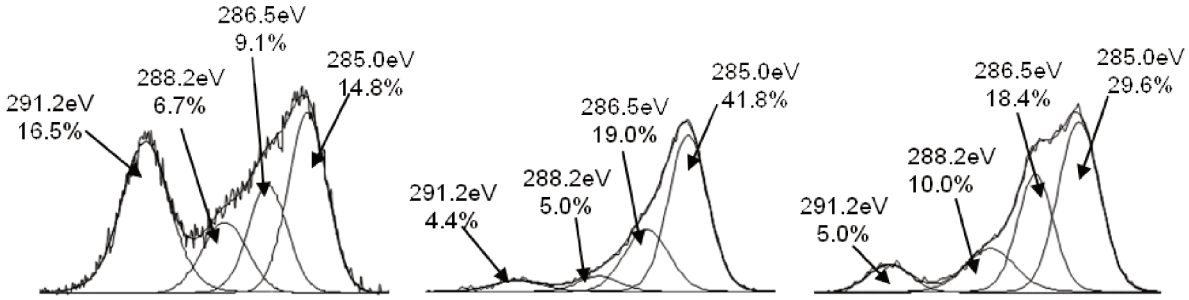
The treated surfaces were characterized by XPS analyses, yielding the atomic percentages of each atom present onto the surface (Table 14). First, the amination of PTFE film was successful given to the incorporation of nitrogen components on the surface (Table 14). Furthermore, chemical derivatization, technique permitting to quantify specifically the amino groups,[84] has been done and 2.7 % of amino groups were detected on aminated PTFE surfaces (data not shown). The ratios O/F and O/C increased significantly after CMD and OxD grafting, which clearly put in evidence the efficiency of the grafting of activated dextran. Indeed, the increase in oxygen could only come from dextran due its chemical structure. Moreover, the surface covering by dextran appeared to be influenced by the degree of modification: higher O/F ratios were obtained for CMD at 50 % and for OxD at 20 % compared to CMD 25 % and OxD 40 %, respectively (Table 14).

Table 14 : XPS survey results at different steps of PTFE surface modifications*

	%C	%F	%O	%N	O/F	O/C
PTFE-NH_2	47.1 ± 1.3	39.0 ± 2.3	1.8 ± 0.3	11.5 ± 1.1	0.05	0.04
CMD 25%, 0.3 g/mL	54.2 ± 0.6	21.4 ± 0.9	17.1 ± 1.8	5.7 ± 0.6	0.80	0.32
CMD 50%, 0.3 g/mL	63.0 ± 4.7	11.4 ± 6.9	19.2 ± 3.7	5.0 ± 0.7	1.68	0.30
OxD 20%, 0.05 g/mL	70.2 ± 1.7	7.7 ± 1.8	15.8 ± 1.2	5.4 ± 0.6	2.04	0.23
OxD 40%, 0.05 g/mL	58.8 ± 2.7	18.7 ± 2.6	15.1 ± 0.2	7.4 ± 0.6	0.81	0.26

* Some contaminations were detected: less than 1% of chlorine for all steps and some sodium after graftings.

It could be also noticed that the O/C ratio was lower for the OxD than the CMD one and the loss of oxygen components corroborated a partial degradation of the polysaccharide structure during the periodate oxidation, as previously noticed in ATR-FTIR. This observation was further confirmed by XPS HR C1s spectra which made possible to distinguish the different chemical bonding through their binding energy (Figure 21). Indeed, the OxD spectrum (Figure 21.b) has a large prevalence of C-C and C-H bonds (285.0 eV) compared to the band at 286.5 eV, assigned to C-N and C-O bonds, whereas polysaccharide main structure was composed of C-O bonds. CMD spectrum did not exhibit such difference in C-C/C-H bands versus C-O band (Figure 21.c). Moreover, the CMD grafting efficiency was confirmed by the increase in amide band at 288.2 eV whereas for the OxD it was less evident as this reaction led to C-N links, overlapping with C-O moieties at 286.5 eV. However, the decrease in CF_2 component at 291.2 eV from PTFE was similar for both way of grafting, meaning that a similar covering of PTFE surface was obtained.



a) b) c)

Figure 21 : HR C1s spectra of a) PTFE-NH_2, b) PTFE OxD 20% c) CMD 50%

The grafting optimization on PTFE showed a better coating of the aminated PTFE surfaces with OxD 20 % and CMD 50 % compares to the other degrees of modification for a same concentration. Thus we carried out first tests on aminated 316L-CF_x samples with these degrees. As for PTFE samples, amino groups on 316L samples were measured by chemical derivatization and a similar amount was obtained. As previously, the grafting efficiency was first proved by survey spectra, with a decrease of the percentage of fluorine and an increase of C and O components (Table 15).

Table 15: XPS survey results at different steps of 316L surface modifications

	%C	%O	%F	%N	%Cl	%Na
CF_x	32.3 ± 0.6	-	67.7 ± 0.6	-	-	-
CF_x-NH_2	31.0 ± 0.1	2.7 ± 0.4	50.8 ± 0.4	14.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	-
CF_x-NH_2 + CMD 50 %	55.3 ± 2.6	23.4 ± 1.6	11.6 ± 0.5	7.0 ± 0.5	-	2.0 ± 0.8
CF_x-NH_2 + OxD 20 %	61.1 ± 2.3	18.9 ± 1.4	11.9 ± 0.6	7.5 ± 0.4	-	0.6 ± 0.5

The higher amount of oxygen was obtained for the carboxymethylation way with an O/C ratio of 0.42 in opposite with the oxidation procedure leading to only 0.31 (Table 15). Hence, the C1s HR spectra evidenced that the dextran main structure was partially lost for OxD (Figure 22).

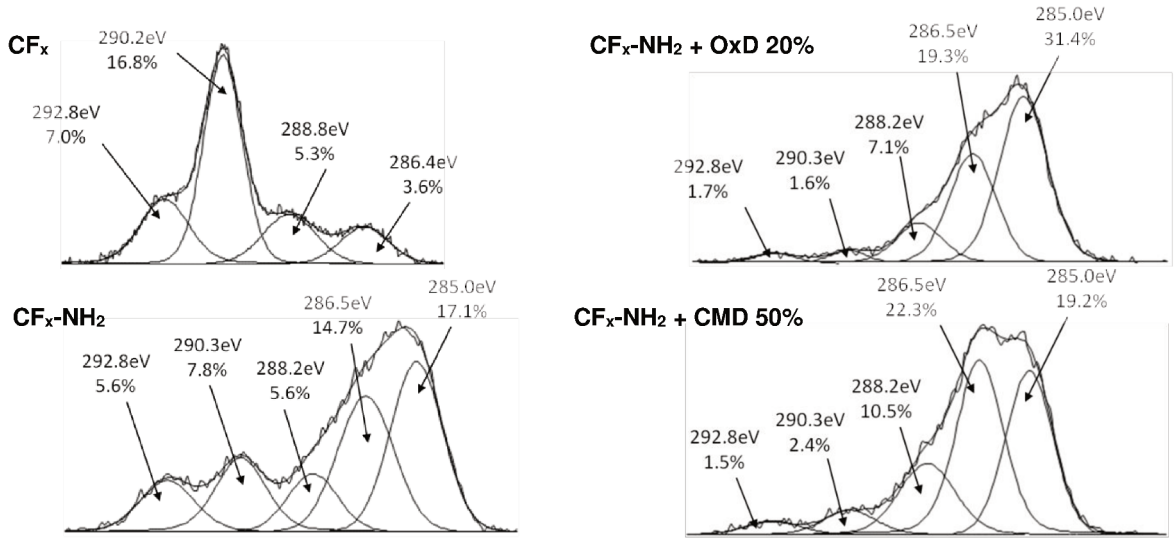


Figure 22 : HR C1s spectra of the different modification steps from CF_x film until activated dextran graftings, with the following bonds: CF_3-CF_3 (282.8 eV), CF-CF (290.3 eV), NC=O/HOC=O (288.2 eV), C-N/C-H (286.5 eV) and C-C/C-H (285.0 eV).

3.6. Conclusions

The grafting with modified dextran on fluorocarbon film plasma-deposited 316L stainless steel substrates for a stent coating application was experimented following a two steps process: 1) Dextran modifications and optimization of graftings processes on PTFE film using different dextran activation ways, carboxymethylation and oxidation, at different degrees of modification, 25 %-50 % of substitution for CMD, and 20 %-40 % for OxD. 2) Graftings with the optimized CMD and OxD conditions on aminated CF_x-316L stainless steel surfaces. The efficiency of dextran modifications were clearly proved in ATR-FTIR by the presence of the expected carbonyl band. The grafting of modified dextran on PTFE and CF_x surfaces were successful as demonstrated by the high amounts of oxygen detected in XPS surveys as well as the decrease of the fluorine content. Furthermore, HR spectra of C1s clearly exhibited an increase of the C-C/C-H, C-N and C-O contributions, as expected. However HR C1s and ATR-FTIR results displayed that the dextran main structure was partially disrupted during the periodate oxidation compared to the carboxymethylation. Therefore, these preliminary results exhibited that the carboxymethylation way permits first to keep the integral structure of dextran and could be, in a second step, grafted on aminated surfaces. Thus for stent coating application, further investigations on dextran modification by carboxymethylation will be done in order to assess the grafting stability to deformation and to pseudo-physiological environment as well as its behavior with cells.

3.7. Acknowledgments

This work was supported by Inserm-FRSQ, University Paris 13, the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Quebec Ministry for International Relations (program Franco-Québécois Samuel de Champlain), the Conseil franco-québécois de coopération universitaire (CFQCU) and the Research Center of Saint-Francois d'Assise.

4. Dextran grafting on PTFE surface for cardiovascular applications

Eléonore C. Michel[1,2], Vanessa Montaño Machado[1,3], Pascale Chevallier[1], Amélie Labbé-Barrère[2], Didier Letourneur[2] and Diego Mantovani[1]

[1]Laboratory for Biomaterials & Bioengineering (CRC-I), Dept Min-Met-Materials Eng. & CHU de Quebec Research Center; Laval University; Quebec City, Canada

[2]INSERM, U1148, Laboratory for Vascular Translational Science; Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

[3]ERRMECe, I-MAT, Département de Biologie, Université de Cergy-Pontoise, 2 Avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France

Keywords: Carboxymethyldextran, surface immobilization, dextran coatings, endothelial cells, smooth muscle cells, anti-thrombogenic property

Ce chapitre a été publié dans Biomatter 4 (2014) e28805

4.1. Résumé

En vue d'applications cardiovasculaires, le dextrane a été greffé sur des surfaces aminées après carboxyméthylation. La réponse biologique est dépendante des propriétés de surface des biomatériaux, il est alors primordial de vérifier l'influence de cette modification sur les propriétés biologiques. Dans cette étude, 3 degrés de substitution (DS) ont été testés et les différents carboxyméthyldextranes (CMD) ainsi obtenus ont été greffés sur des surfaces de PTFE. Le DS a été évalué par RMN-^{1}H, FTIR et conductimétrie, alors que la composition des surfaces greffées a été analysée par XPS. Les performances biologiques des revêtements en termes d'hémocompatibilité et d'adhérence cellulaire ont été ensuite évaluées. Comparativement au PTFE, les surfaces greffées CMD de DS 0.2 présentent de meilleures propriétés anti-thrombogéniques mais aussi favorisent l'adhérence des cellules endothéliales versus celle des cellules musculaires lisses. Ce travail suggère donc la possibilité d'obtenir des biomatériaux polyvalents proactifs convenables pour différentes applications biomédicales.

4.2. Abstract

The modification of biomaterial surfaces with biomolecules influences the biological response. In this work, caboxymethyldextrans (CMD) with different degrees of substitution have been grafted to surfaces by introduction of amino moieties directly onto the substrate surface. Polytetrafluoroethylene was selected as a model substrate for biomaterial as it is already largely used for cardiovascular clinical applications. Firstly, CMD polymers were characterized by FTIR, ^{1}H-NMR, and conductimetric titration. Then, the coatings have been analyzed by XPS to confirm the grafting and determine the composition. Once characterized, biological performances of CMD coatings were investigated. The hemocompatibility was ascertained using the free hemoglobin method. The effects on endothelial and smooth muscle cell adhesion were also studied. Results indicated that CMD at a 0.2 substitution degree, significantly influenced the biological property of PTFE by exhibiting non-thrombogenic properties as well as enhancing endothelial cell adhesion along with limiting smooth muscle cell adhesion. This work suggested the creation of versatile pro-active biomaterials suitable for different biomedical applications.

4.3. Introduction

When it comes to the recovery of atherosclerotic diseases, the healing process is modulated by three major actors: blood components, endothelial and smooth muscle cells. Once implanted, the interactions taking place between the cardiovascular biomaterial and these components play a crucial role. Indeed, the device should avoid thrombi formation and favor the endothelium healing along with limiting smooth muscle cell proliferation, which would avoid obstruction of the vessel.[32,38]

To address this issue, one approach is to coat the material with biomolecules able to influence the biological response.[27,50] Several studies, investigating various biomolecules, were reported over the past decade in the literature. Among them, polysaccharides have shown a great potential mainly due to their large range of action. To name only a few, heparin is well known for being antithrombotic and antiproliferative, hyaluronic acid for decreasing the inflammatory response and dextran for its low-fouling ability.[47,78,81,87,145–147] However, these coatings were merely deposited on the material and the long term stability towards stresses imposed by the biological, chemical and physical environment was only rarely studied.

Carboxymethyldextrans (CMDs) have been widely studied as their carboxylic functions enable reaction with surfaces either with bioactive molecules. On one hand, results showed that CMDs-based coatings were able to avoid non-specific protein and cell adhesion.[51,52,62,118,148,149] The covalent grafting of CMDs molecules onto surfaces was optimized by varying the degree of substitution of CMDs and the grafting approach. The most common ways of grafting involve functionalized polymer layers as linking arms for CMDs coatings, like polyheptylamine, polyethyleneimine or polyethylene glycol. This strategy was found efficient against cells, like fibroblasts[103,104], epithelial[52] or endothelial[51,62,118,148] cells, and proteins, like albumin or lactoferrin[149]. On a second hand, studies focused on CMD as a spacer molecule with an ability to limit non-specific protein adsorption, on which bioactive molecules were grafted, known to involve specific response such as RGD peptides[51,62,118,148] (for HUVECs adhesion enhancement), antibodies[150] (for ELISA test) or fibronectin[151] (for its effect on insulinoma cell function).

However, these studies demonstrated that the repellence properties highly depend upon the fabrication protocol used to generate the coatings. Furthermore, the use of polymer layers to graft CMD molecules may led to an entanglement of CMD chains with the interlayer chains, thus the repellence property may not be only related to the CMDs. In contrast, the approach in this work is to graft directly CMD molecules, meaning with no interlayer, on amines introduced by plasma treatment on the surface of PTFE samples, which is a polymer widely used in cardiology. With this approach the coatings are expected to present only CMD chains. The global aim of the project is afterward to covalently graft on aminated surfaces a dextran-rich copolymer via carboxyl functions. In this context, CMDs with different degrees of substitution were firstly synthesized and characterized. Before carrying out the biological assays, coatings were fully characterized with XPS analyses. Once CMD grafting was found feasible with the approach used, cells behaviors were studied. In addition, interactions between the CMD coatings and blood were investigated by clotting time assays.

4.4. Materials and Methods

4.4.1. Dextran modification

The synthesis of dextran (Dx) into carboxymethyldextrans (CMDs) was adapted from Löfas and Johnsson[107] and three CMDs were synthesized: CMD 0.2 ; CMD 0.4 and CMD 1.3 . For CMD 0.2 and CMD 0.4, 12 g of dextran (TCI Europe, D1449) were dissolved in 80 mL of 6.25 N NaOH previously cooled in an ice bath. Then, respectively, 7.0 g or 17.5 g of monochloroacetic acid (MCA, Janssen Chimica, 10 851 84) dissolved in 20 mL of water were introduced. The mixture was maintained at 60°C for 60 min then cooled at room temperature and neutralized by addition of concentrated acetic acid. The polymer was then precipitated in methanol, recovered by filtration, rinsed with diethylether and dried under vacuum at 50°C after diethylether evaporation. In order to purify CMD from unreacted acids and solvents, the polymer was dissolved again, two times, in deionized water and precipitated and dried as previously. CMD 1.3 was synthesized from two successive carboxymethylation reactions: Both syntheses were done as for CMD 0.4 but during 90 min.

Degrees of substitution (DS) were assessed using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H-NMR) and acid-base conductimetric titration, as the amount of carboxyl groups on anhydroglycopyranoside units.

For ^{1}H-NMR analyses, CMDs were dissolved in D_2O (≈20-30 g/L) and proton-1 spectra were recorded on a Bruker AM 500 (500 MHz).

The titration was adapted from Capitani et al..[152] Briefly, after being dried and weighted, about 0.1 g of CMD were acidified in a 0.01 M HCl solution for 10 min, before being titrated with a freshly made 0.03 M NaOH solution and the solution conductivity was measured with a conductimeter. The conductivity decreased rapidly, corresponding to H-ions neutralization from the strong acid, then a plateau was observed due to the neutralization of the weak COOH acid groups, and finally the conductivity increased with the excess amount of OH-ions. Each CMD was titrated three times.

4.4.2. Surface modification

Polytetrafluoroethylene (PTFE) films of 250 µm of thickness (Goodfellow Corp., FP301350) were cut to size 5cmx5cm samples and cleaned with ultrasonic bath during 10 min in acetone, in nanopure water then in methanol and dry with particles free compressed air before use. In order to introduce amino functionalities onto the surface of the samples, an atmospheric plasma treatment was carried out.[153] Samples were placed in a conventional parallel-plate dielectric barrier discharge (DBD) reactor on the grounded electrode. Gas flow (95% N_2 + 5% H_2) was introduced directly between the electrodes through a diffuser and was maintained constant at 10 L/min. The frequency, the applied voltage, the gas gap and the treatment time were kept constant (3 kHz, 15 kV, 1 mm and 60 s). Before and after each plasma treatment, the plasma chamber was purged for 5 minutes to

ensure homogeneity and gas purity for the discharge and to avoid post-plasma oxidation reactions with free radicals or unstable functional groups present on the surface.

CMDs were grafted onto aminated substrates immediately after plasma treatment, using water soluble carbodiimide chemistry.[154] First, CMDs were dissolved in Phosphate Buffer Saline (PBS, pH=7.4) at a concentration of 2 mg/mL. Activation of the solution was achieved via the addition of N-ethyl-N′-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma-Aldrich, 03450) and N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich, 130672). For CMD 0.2, CMD 0.4 and CMD 1.3, respectively 76 mg, 155 mg and 473 mg of EDC and 46 mg, 93 mg and 280 mg of NHS was added in 10 mL of CMD solutions and were allowed to react for 10 min. Aminated PTFE films were then immersed in activated CMD solutions for 24 h on a rocking table, followed by rinsing twice in 1 M NaCl solution and four times in nanopure water, under vortex agitation. CMD grafted surfaces were dried with particle free compressed air and store under vacuum before use.

4.4.3. Surface characterization

Samples surface chemical composition was assessed using an X-Ray Photoelectron PHI 5600-ci Spectrometer (XPS, Physical Electronics USA, Eden Prairie, MN, USA). Survey spectra were acquired at a detection angle of 45° using the Kα line of a standard aluminum X-ray source (1486.6 eV) operated at 200 W. Charge compensation was only required for PTFE film analyses for survey analyses whereas high resolution spectra were obtained with a standard Mg X-ray source (1253.6 eV) at 150 W with no charge neutralization. Detection was performed with a take-off angle of 45° on a 0.5 mm^2 area. At least, three measurements per sample were made on three different samples to ascertain the homogeneity and the reproducibility of the surface chemistry.

Static contact angle measurements were performed on samples using a VCA Optima XE system (AST Products Inc., Billerica, MA, USA). Drops of deionized water (1 µL) were deposited on surfaces and pictures were taken within 5 sec. Contact angles were measured from, at least, five drops per sample, randomly deposited, and followed by triplicates. The angle value was taken as an average of the number of measures taken for right and left angles.

4.4.4. Hemocompatibility

CMD grafted PTFE films were punched in 15 mm diameter disks and rinsed with ethanol to remove any residues from the punch. After air drying, samples were fixed in 24-well plates with tissue adhesive (3M™ Vetbond™, 1469SB). In order to study the coagulation time on each sample, the hemoglobin free methodology was performed. 50 µL of citrated blood was dropped onto the specimens and 10 µL of $CaCl_2$ were added immediately. Samples were incubated at 37 °C during 40 and 80 min, then 2 mL of distilled water were added to each specimen. Red blood cells not entrapped in a thrombus were hemolysed and free hemoglobin molecules

in the water were colorimetrically measured by monitoring the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer ELISA reader (BioRad mod.450, Mississauga, Ontario, Canada). The test was performed in triplicate with 6 samples per condition using a different donor for each triplicate.

4.4.5. Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) and Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells (HUASMCs) were isolated from an umbilical cordon kindly provided by the Saint François d'Assise Hospital (Quebec, QBC, Canada) with the previous consent of donor mothers.

To extract HUVECs, the vein was rinsed with PBS, filled with trypsin 10x and incubated 15 minutes at 37°C. Afterwards, PBS was added to inhibit trypsin effect and the solution was recuperated and centrifuged at 1000 rpm during 5 min. The supernatant was removed and HUVECs were cultured in a flask (previously coated with gelatin) with M199 (Thermo Scientific, SH30253.01) culture media containing 10% of fetal bovine serum (Fisher Thermo Scientific, SH30396.03) and 1% of Penicillin-Streptomycin (Gibco, 15140-122). Culture media was changed after 24 h and then each 48 h until confluence.

HUASMCs were isolated from human umbilical cord artery. Initially, the Wharton's jelly that surrounds the arteries was carefully removed by cutting with scissors. Afterwards, the arteries were chopped to rectangle pieces using scissors and finally placed in a Petri dish with M199 medium. After two weeks, rectangle pieces of the artery were removed and the cells were expanded. Cells were characterized by immunostaining and third to eighth passages were used to evaluate the interaction with the coated surfaces.

Cell seeding. CMD grafted PTFE films were punched in 9 mm diameter disks and rinsed with ethanol to remove any residues from the punch. After air drying, samples were fixed in 48-well plates with Silastic® medical adhesive (silicone, type a, Dow Corning Corporation), sterilized by immersion in ethanol for 5 min and rinsed 3 times with PBS (pH=7.4). Then, cells were removed from the culture plates by rinsing in PBS and incubating in a trypsin solution. After trypsin inactivation with complete medium the cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm. The resulting pellet was resuspended in complete medium. In one hand, 40 000 HUVECs/cm^2, in the other hand, 20 000 HUASMCs/cm^2 were poured into the wells in 250 µL medium.

Cell adhesion. After 1 h and 6 h of incubation at 37°C, for HUVECs and HUASMCs respectively, the medium was removed and samples were rinsed two times with serum and growth factor free medium. Non-adherent cells were removed by washing 3 times with serum-free medium and fixed for 15 minutes with glutaraldehyde 1% (Sigma Aldrich, G5882) followed by 3 washes with deionized water and permeabilized with a triton (Sigma Aldrich, X100) solution 1% in PBS for 15 min. Samples were then saturated with casein 1% in PBS during 30 min, washed 3 times with PBS and immersed in a solution of DAPI (Sigma Aldrich, 32670) (1:3000) and phalloidin TRITC labeled (Sigma Aldrich, P5282) (1:300) in PBS during 45 min at room temperature. Cells were rinsed three times with PBS and images were recorded under a fluorescence microscope Olympus BX51

(Olympus America Corp., Tokyo, Japan) using 10x and 20x objectives. Three representative images were took per sample and cells were counted using Image J software.

4.5. Results and discussion

4.5.1. Carboxymethyldextran synthesis

The carboxymethylation of dextran should be well-controlled in order to assess specific substitution degrees. Indeed, the substitution degree (DS) of CMD could affect its subsequent grafting on biomedical devices and therefore could induce changes in the biological response. Thus, synthesized CMDs were characterized by ^{1}H-NMR (Figure 23), FTIR and the DS was also confirmed by conductimetry.

FTIR analyses (spectra not shown) evidenced the efficient substitution of dextran with carboxymethyl groups by the detection of a new peak at 1590 cm^{-1}, associated to the carboxyl stretching band of COONa moieties. ^{1}H-NMR analyses (Figure 23) permitted to get more information on the synthesized products such as the degree of substitution and the purity. On the dextran spectrum, the anomeric proton (H1) in C1 position was identified at 5.00 ppm, and protons (H2-H6) at the C2-C6 positions were detected at 3.52-4.02 ppm. CMDs syntheses were confirmed by the detection of new peaks: at 4.12-4.19 ppm, attributed to the protons of the carboxymethyl moieties, noted a on Figure 23.b, and at 5.13 ppm (H1'), associated to the anomeric proton of a C2 position substituted unit. All chemical shifts obtained agreed with the literature.[113]

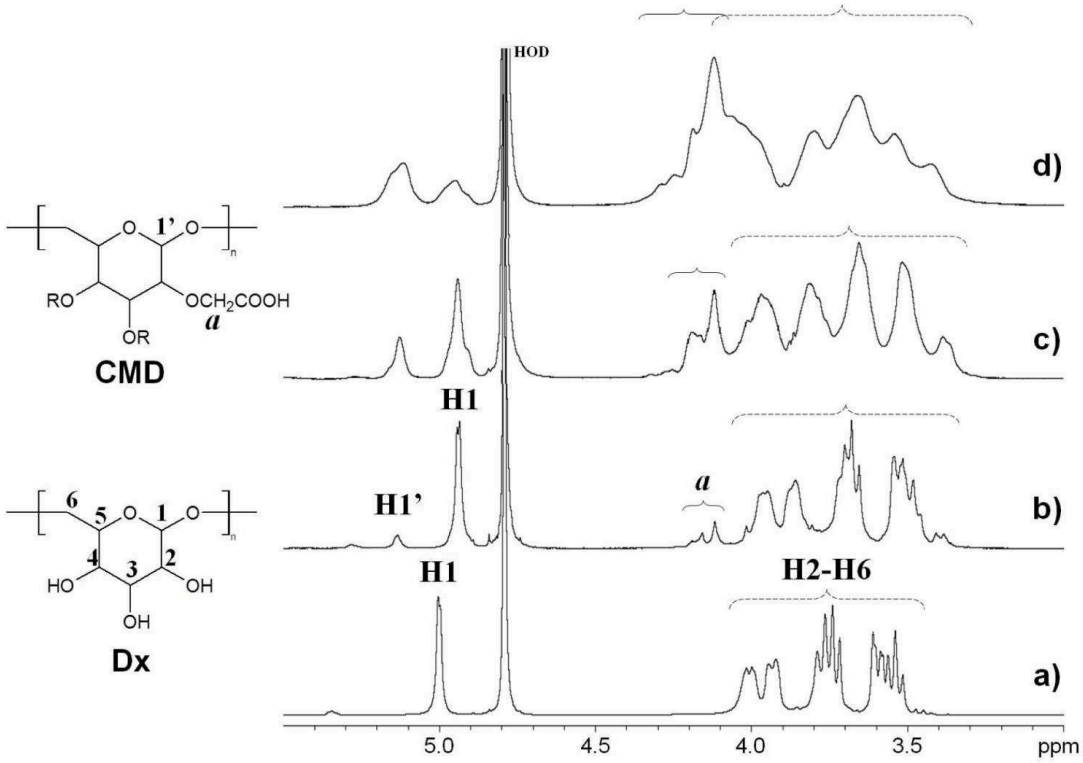


Figure 23: ^{1}H-NMR spectra of: a) dextran T70 ; b) CMD 0.2 ; c) CMD 0.4 ; d) CMD 1. H1 peak represents the anomeric proton, H2-H6 (dash line) are the remaining protons of the anhydroglycopyranoside unit of dextran. H1' is the anomeric proton when the position 2 is substituted. a (plain line) peaks represent the protons of carboxymethyl groups.

^{1}H-NMR spectra also enlightened contaminant peaks representatives of residual acids (residual acetic acid, unreacted monochloroacetic acid and side-produced glycolic acid) and solvents (diethyl ether and methanol) after the first precipitation ensuing the synthesis (data not shown). Several dissolution/precipitation steps followed by a low heating of CMDs dissolved in water and freeze-dried, had been required to eliminate remaining acids and solvents. All these purification steps were essential to obtain CMD pure at 98% suitable for biomedical applications.

After purification, the different degrees of substitution were assessed by ^{1}H-NMR and acid/base titration (conductimetry measurements). The substitution degree was defined by the ratio of carboxymethyl (CM) groups to anhydroglycopyranoside ring units. On ^{1}H-NMR spectra, the carboxymethyl quantity was determined by the integration of a peaks and for anhydroglycopyranoside unit by the addition of H1 and H1' integrals (Eq. 1). As for the conductimetric titration, the amount of CM groups was related to volume of NaOH of the plateau (V_p) and the DS was calculated from the concentration NaOH solution, C_{NaOH}, and the mass of dry pure CMD, m_{CMD} (Eq. 2). All results are reported in Table 16.

Table 16: Degree of substitution assessed by ^{1}H-NMR and acid-base titration method. Dx/MCA is the molar ratio of dextran on monochloroacetic acid used for each synthesis.

CMD	Ratio Dx/MCA [mol/mol]	Degree of substitution	
		^{1}H-NMR	Titration
CMD 0.2	1.0	0.17	0.18 ± 0.02
CMD 0.4	2.5	0.37	0.43 ± 0.01
CMD 1.3	2.5*	1.32	1.19 ± 0.05

*Dx/MCA value for each of the carboxymethylation step which was done two times in this case.

DS determined from the titration confirmed the results obtained with ^{1}H-NMR, exhibiting values in the same range. Values from the two methods appeared very similar for the two lowest substituted CMD (i.e. CMD 0.2 and CMD 0.4) whereas for CMD 1.3, the DS from ^{1}H-NMR was slightly higher. This latest was probably due to a less accurate integration of the carboxymethyl signal (a, plain line) as it very overlapped with the signal from the protons of dextran chains (H2-H6, dash line). Finally both methods, gave expected values of DS versus the ratio of dextran (Dx) to monochloroacetic acid (MCA) used for the carboxymethylation reactions, attesting of a controlled synthesis.

Equation (1)

$$\frac{\int a/2}{\int \mathrm{H1} + \int \mathrm{H1'}}$$

Equation (2)

$$\frac{C_{NaOH} \times V_P \times M_{Glc}}{m_{CMD} - (C_{NaOH} \times V_P \times M_{CM})}$$

with M_{Glc} = 162 g/mol and M_{CM}=$M_{CH2\text{-}COONa}$= 80 g/mol

4.5.2. CMD immobilization on aminated PTFE surface

The surface modifications were followed at each step by XPS analyses and contact angle measurements. The surface chemical compositions assessed by XPS survey spectra were summarized in Table 17.

The elemental composition of virgin PTFE, determined by XPS, was as expected with a F/C ratio of 2. After N_2/H_2 plasma treatment, the appearance of nitrogen component indicated the success of PTFE surfaces modification with a decrease of the F/C ratio from 2 to 0.82 compared to untreated PTFE. The N-containing molecules introduced on the surface could be amine, amide, nitrile or imine groups.[155] The amount of amino groups was therefore assessed by vapor phase derivatization as described elsewhere,[85] leading to a relative percentage of 3.4 ± 1.0% of amines. This indicated a high selective plasma treatment as ~ 60% of the N-containing species initially introduced (i.e. 6.7 ± 0.7 %) were amino moieties. According to literature, 2-3.5 % of NH_2 relative surface concentration correspond to 0.5-2 amine molecules/nm^2,[85] which is a sufficient density to further graft carboxymethyldextran synthesized from 70 kDa dextran.

Table 17: Surface chemical composition obtained from XPS survey spectra for PTFE before and after plasma treatment and CMDs grafting.

	C (%)	F (%)	N (%)	O (%)	O/F
PTFE	33.3	66.6	-	-	-
PTFE-NH_2	49.6±1.0	40.9±2.1	6.7±0.7	2.1 ±0.5	0.05±0.01
CMD 0.2	49.8±2.4	31.7±4.2	2.2±0.5	13.5±1.7	0.44±0.11
CMD 0.4	49.9±3.7	32.7±5.8	1.9±0.5	14.6±2.8	0.47±0.19
CMD 1.3	52.1±2.6	31.1±3.0	3.9±0.7	11.4±1.7	0.37±0.08

Some contaminations were detected: Cl less than 1.0% and Na less than 1.6% at the maximum.

To favor the grafting of CMD molecules, the ratio of reactants (EDC and NHS) to the degree of substitution was constant and superior to 1 to prevent side-reactions: EDC-NHS:COO at 20:1. The CMD grafting onto aminated PTFE was attested by the significant increase of oxygen component associated to the dextran structure (Table 17). The three CMD coatings led to similar surface composition as exhibited by XPS results. However, regarding the O/F ratios, only small variations had been observed between the coatings and suggested the amount of CMD present on the surface and/or the thickness of the coating were slightly higher for CMD 0.4 with the highest ratio. The hydrophilic character provided by dextran moieties was clearly evidenced by water contact angle measurements: CMD coated samples were more hydrophilic than bare PTFE (Figure 24). Furthermore, the hydrophilic property increased along with the O/F ratio obtained by XPS (Figure 24 and Table 17). Still, no significant difference had been revealed between CMD coatings, meaning that the increasing substitution degree of dextran by carboxymethylation did not influence the grafting efficiency.

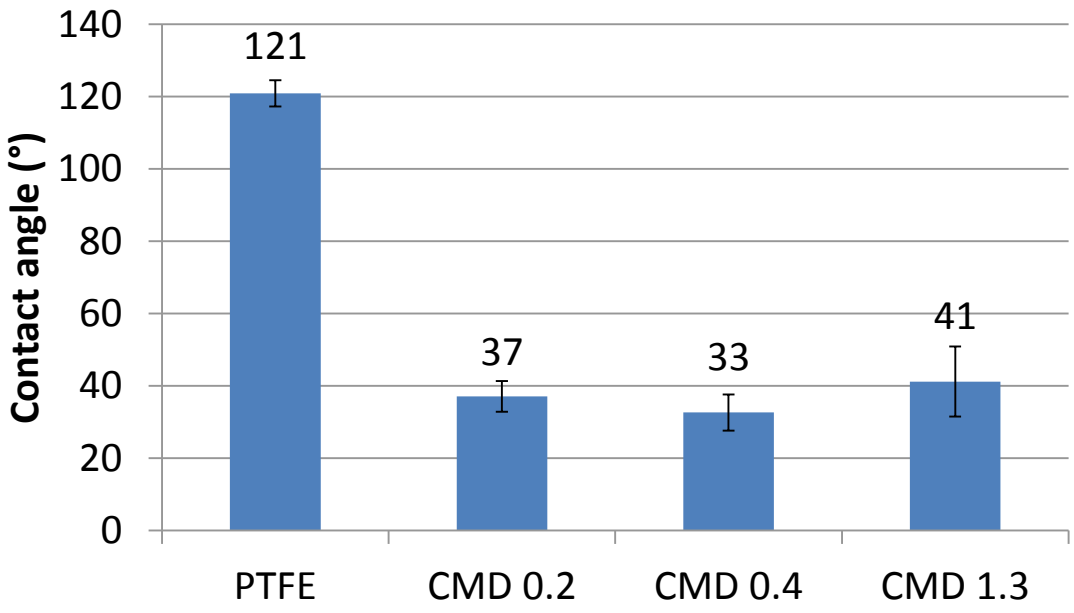


Figure 24: Contact angle measurements with water on bare PTFE and modified with CMDs. PTFE: 120,9°±3,7° ; CMD 0.2: 37,1°±4,2° ; CMD 0.4: 32,7°±5,0° ; CMD1.3: 41,2°±9,7°. n > 5.

In order to gather more information, high resolution XPS were carried on C1s, giving the type of bounds present on samples surfaces (Figure 25). Once again, CMD immobilization was confirmed by the significant increase of C-N and C-O bonds signal (286.5 eV) compared to plasma treated film. Indeed, as no nitrogen is contained in CMD, this increase was only due to C-O functions present in the polysaccharide chains. Moreover, high resolution C1s spectra of CMD coatings confirmed that the fluorine detected in survey spectra came from PTFE, as shown by CF_2 bonds at 291.5 eV. The detection of PTFE substrate suggested CMD layers thickness less than 5 nm (XPS analysis depth) and/or an incomplete coverage of the PTFE surface (XPS surface analysis of 0.5 mm^2). The results obtained in C1s high resolution corroborated the previous XPS survey results (Table 17) by showing no significant difference between CMD coatings. It could be also noticed that the contribution of the signal at 288.5 eV (carboxyl and amide bonds) were slightly more important for CMD 1.3 compared to the others. It may be due to the highest substitution degree thus leading to more free carboxylic groups and/or more amide bounds formed. In addition, it should be mentioned that CMD 1.3 exhibited a slight lower CF_2 composition compared to CMD 0.2 and CMD 0.4 coatings, suggesting a thicker or higher coverage.

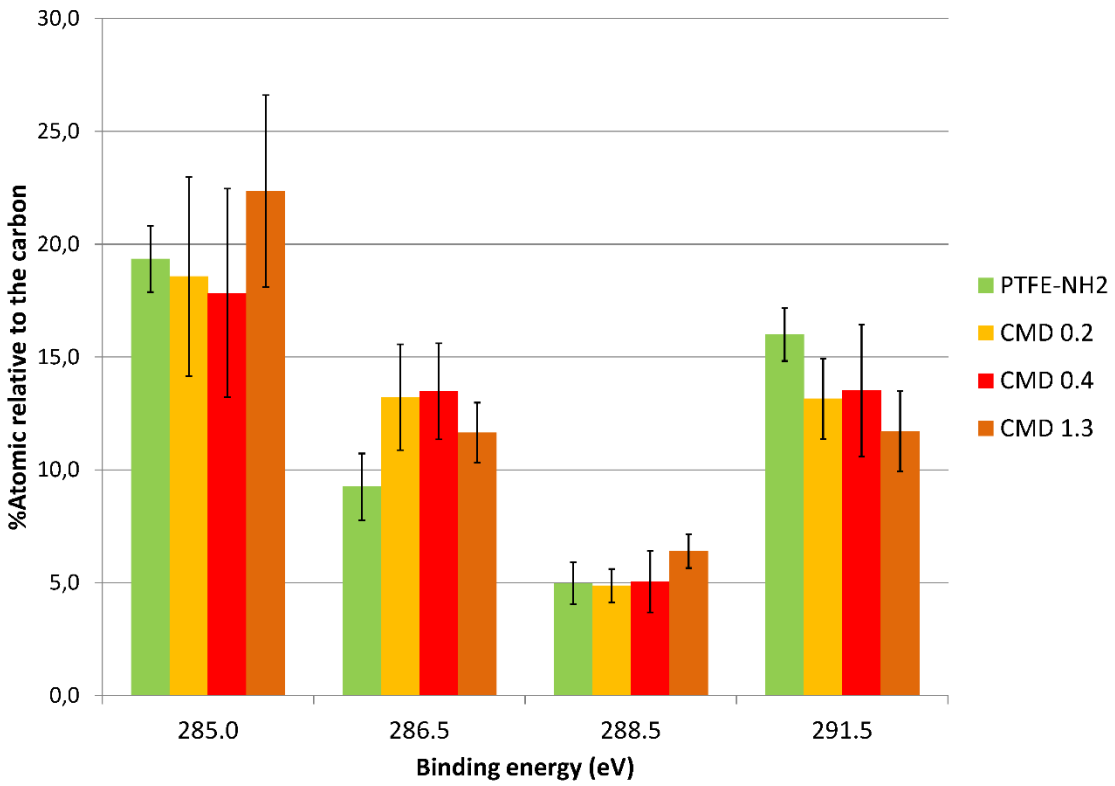


Figure 25: Relative percentage from XPS high resolution on C1s with the following bonds: CF2 (291.5eV) ; NC=O/HOC=O (288.5eV) ; C-N/C-O (286.5eV) and C-C/C-H (285.0eV). n = 3

The presence of CMD on PTFE substrate was clearly evidenced by XPS analyses as well as contact angle measurements. Nevertheless, the covalent links formed between the carboxymethyl groups of CMD with the amines from surface could not be confirmed by high resolution as carboxylic and amide signals overlapped

(288.5 eV). Indeed, the presence of CMD upon the substrate and its low amount could be associated to different parameters: physisorption, ionic binding, steric hindrances or a lack of amino groups, which would limit the covalent binding of molecules.[156] The adsorption of CMD molecules onto aminated PTFE is very unlikely and previous study agreed.[52] Furthermore, as the grafting was carried out at pH 7.4, thus with a low faction of protonated amines on the surface,[156] the ionic binding should be limited. The ones occurring should have been definitely eliminated by NaCl washing. Evidences of covalent binding between activated surfaces and CMDs were usually not provided either in the literature.[52,62,102,149,157] According to previous studies, by opposite to this work approach with anchoring points (amines) directly on the surface, interlayer by plasma polymerization deposition were used in order to fully cover the substrate: for example, with n-heptylamine (Happ)[52,62,102,104,111,118,151,157] or acetaldehyde deposition followed by a polyethyleneimine interlayer (AApp-PEI)[51,52,102,157,158]. Despite the different ways of grafting, the chemical composition of CMD coatings on Happ reached in literature were similar to the one obtained, namely with O/C ratios found around 0.2 to 0.3.[52,62,102,149,157] Both approaches exposed the same amine density at 0.5-2 amine molecules/nm². Consequently, the amines accessibility of an aminated plasma polymer layer or a direct aminated surface appeared to have no influence on the amount of CMD grafted. This clearly evidence that the main limiting parameters to grafting efficiency lies in the steric hindrance produced by dextran's molecular dimension (70 kDa with a hydrodynamic diameter of ≈ 13 nm in PBS[96,159]). Moreover, several studies postulated that the repellent properties of dextran towards proteins and cells highly depend upon the mode of fabrication of the coating.[52,101,160]

4.5.3. Biological behavior

The CMD grafting effects on biological properties have been evaluated by testing the coatings interactions with blood and cells: clotting time assessments by using whole blood and cell adhesion tests with endothelial cells (HUVECs) and smooth muscle cells (HUASMCs).

The influence of the CMD grafting on clot formation was evaluated by measuring the free hemoglobin absorbance after 40 and 80 minutes of contact with blood (Figure 26). At 40 minutes, only CMD 0.2 showed a significant difference with bare PTFE, revealing that the clot barely started to be formed. Significant differences were found between the coatings CMD 0.2 and CMD 1.3 while CMD 0.4 was not different for either of the other coatings. At 80 min, all CMD coatings were significantly different from bare PTFE, exhibiting better non-thrombogenic surfaces. Like the observations made at 40 min, CMD 0.2 was significantly different from CMD 1.3 and no difference between other CMD coatings was found. The clotting time assay evidenced that CMD coatings, regardless the CMD substitution degree, delayed the coagulation cascade compared to bare PTFE. For both times, CMD 0.2 exhibited the best non-thrombogenic properties: higher amount of free hemoglobin after 40 and 80 min (Figure 26). In addition, it seemed that the thrombogenic effect of CMD coatings tends to increase with the substitution degree, even if no significant differences were found for some coatings.

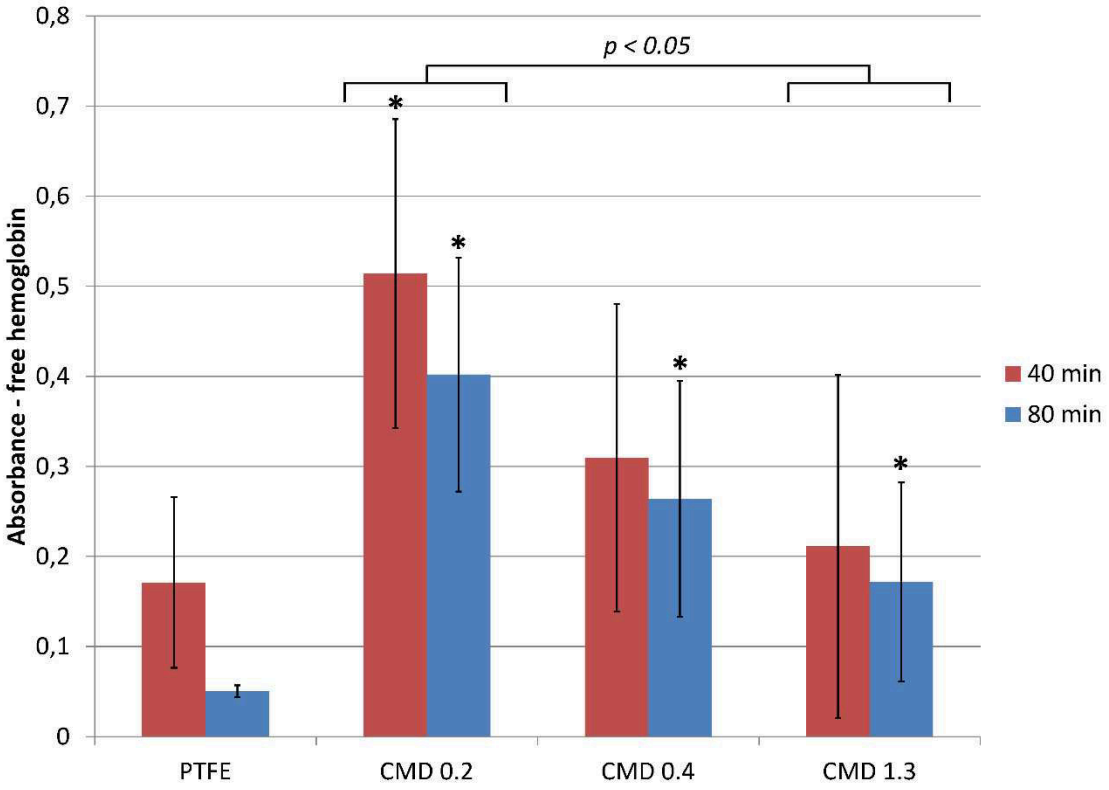


Figure 26: Clotting time evaluation by free-hemoglobin absorbance measurement. * indicates the values significantly different from PTFE for each time determined by ANOVA one-way $p<0.05$.

Dextran solutions were used as blood plasma substitutes.[161] No studies have yet deeply investigated the interaction between blood and grafted dextran, however some previous studies exhibited dextran coatings able to prevent plasmatic proteins adsorption,[101,149,162] which is a first step to the anti-thrombogenic property. Moreover, it has been demonstrated that the structure of the polysaccharide in the coating influences the protein adsorption. According to the XPS analyses, it is assumed that the high amount of carboxymethyl groups in the CMD 1.3 coating provided more anchoring points with the surface and more free carboxylic functions compared to the CMD 0.2. As a consequence, if the chains conformation could be similar for all CMDs at a dry state, CMD 1.3 chains in solution may be constrained by the multiple anchoring points while CMD 0.2 chains may be more flexible (Figure 29). The flexibility of the chains would confer a hydrogel-like microstructure to coatings, which would decrease along with the increase of the substitution degree. This hypothesis may explain the differences observed in the clotting time assay between the CMD coatings. Furthermore, as effects on clotting time were observed (Figure 26), it could be presumed that CMD coatings had a repellent effect on some of the plasmatic proteins, which would support the delay of the coagulation cascade. These results obtained with whole human blood, suggested that the grafted dextran in the CMD coatings exhibited antithrombotic properties.

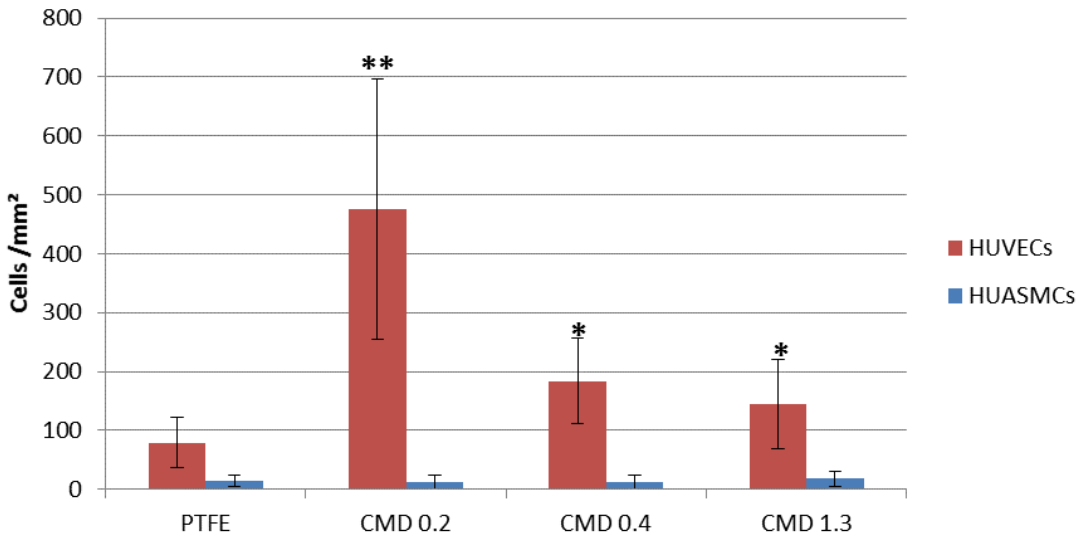


Figure 27: HUVEC and HUASMC adhesion on CMD grafted PTFE surface and bare PTFE. * and ** indicates the values significantly different respectively from PTFE and all other samples, determined by one way ANOVA $p<0.05$.

Cell behavior was assessed through the adhesion of human endothelial (HUVECs) and smooth muscle cells (HUASMCs). As showed in Figure 27, CMD coatings exhibited poor HUASMC adhesion like PTFE with no significant difference between neither of surfaces. For HUVEC adhesion (Figure 27 and Figure 28). On HUASMC adhesion, it was not possible to characterize actin filaments as cells were not spread or absents. In contrast, HUVECs appeared in a round shape with no actin filaments on uncoated PTFE whereas some actin filaments were observed on CMD coatings showing a first state of spreading (Figure 28). Nevertheless, as spreading was still not evident, further experiments at longer term, as proliferation tests, are required to confirm the viability of HUVECs on the surfaces. The image analyses of HUVECs on CMD coatings, also revealed cells not homogenously distributed all over the samples which implies heterogeneous coatings. Although XPS analyses exhibited similar composition of CMD coatings on all the surfaces, once in solution, the coatings structures should be different (Figure 29). The CMD chains would be randomly attached all over the surface leading to different conformations and chemical compositions at the cell scale.

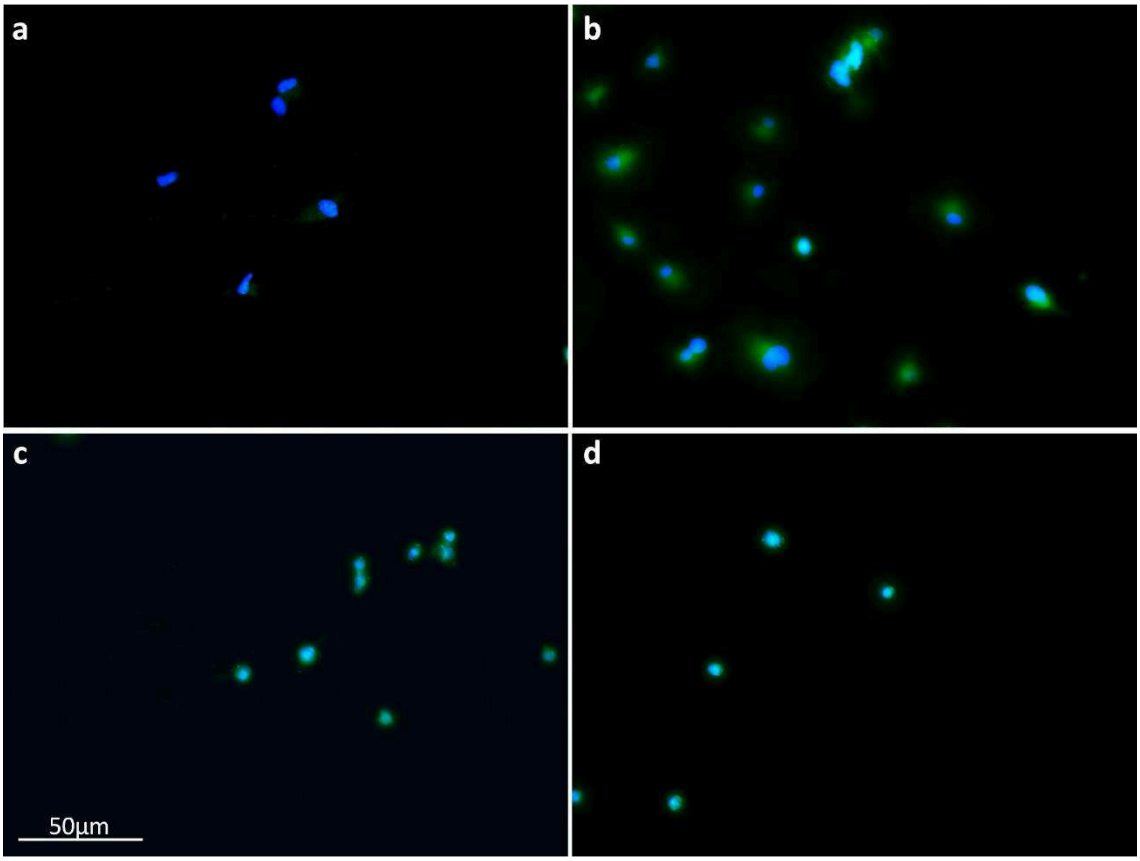


Figure 28: Adhesion tests with endothelial cells. a) uncoated PTFE ; b) CMD 0.2 ; c) CMD 0.4 ; d) CMD 1.3.

Hadjizadeh et al. studied the effect of different CMD coatings (synthesized from Dx 70 kDa, with a DS of 0.5) on HUVEC adhesion and spreading.[51,62,118] For all the coatings, very little or no HUVEC adhesion was observed. As stated previously, the cell repellence effect highly depends upon the coating fabrications. The two approaches used in Hadjizadeh et al., were with AApp-PEI and with Happ, also the Happ-CMD coatings have similar chemical composition to the CMD coatings provided in this work (i.e. O/C ≈ 0.2-0.3) from the XPS analyses. Mainly, CMD 0.4 and Happ-CMD of Hadjizadeh et al. coatings should have similar structure and composition as they have similar DS and way of grafting. However, the Happ-CMD exhibited ≈1 cell/mm² after two hours of adhesion when CMD 0.4 exhibited ≈183 cells/mm² after one hour. This suggested that the different grafting approaches led to different structures and chemical functionalities, which afterward influence the cell response.

Many studies investigated the influence of the coating fabrication on the repulsion of proteins or cells and they agreed that, overall, a minimum of packing density or coverage is required for the coatings to be efficients.[101,104,157] In addition, they stated that the low-fouling ability of a coating is related to the repulsive steric-entropic, hydration and electrostatic forces.[104,149] These latest hindrances may explain the difference noticed between CMD coatings towards HUVEC adhesion. Indeed, the lower amount of carboxyl functions on

the CMD 0.2 would lead to a lower amount of chains grafted on the surface with a high mobility in solution (Figure 29), exhibiting very low steric-entropic and electrostatic forces. Then, the coverage and the compactness of the coating would be insufficient to repulse cells. Moreover, it seemed the CMD 0.2 would adopt a conformation slightly in favor to HUVEC adhesion. On the contrary, the CMD 1.3 increases the steric-entropic forces of the coating, and the free carboxyl functions present more negative charges. Therefore, CMD 1.3 may expose more important repulsive forces to the cells, avoiding their adhesion. Nevertheless, if the adhesion of all types of cells were ruled by these forces, same observations should have been made on HUASMC adhesion. Thus, according to our results (Figure 27), the type of cell must also be taking into account.

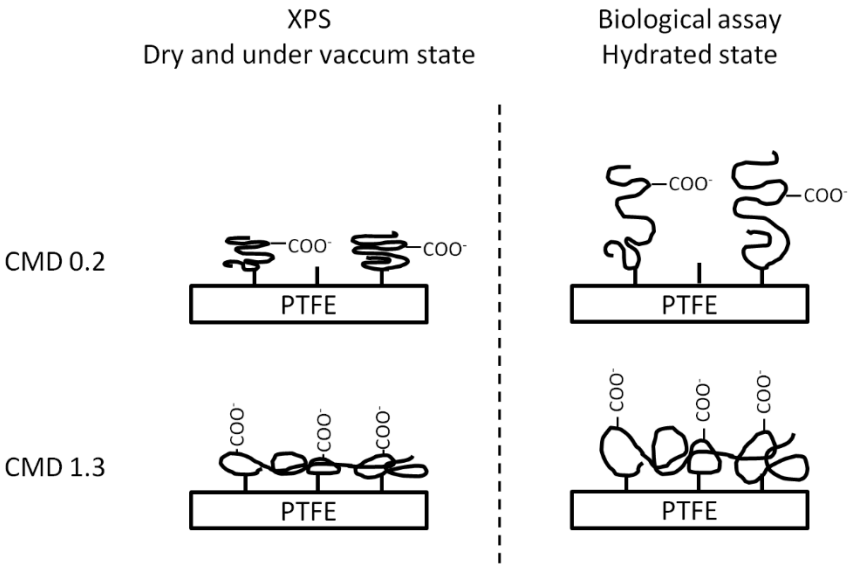


Figure 29: Suggested CMD 0.2 and CMD 1.3 coatings topography depending on the environment.

Finally, even if all the interactions taking place between biological components and biomaterials are not fully understood, it remains that CMD 0.2 coating showed a suitable biological behavior, improving the non-thrombogenic properties of uncoated PTFE and allowing at the early stage HUVEC adhesion while avoiding HUASMC adhesion.

4.6. Conclusions

Dextran was successfully modified with carboxylic functions from a well-controlled carboxymethylation reaction. The degree of substitution of carboxymethyl dextrans were assessed from ^{1}H-NMR spectra and conductimetric titration and we obtained three highly pure CMDs: CMD 0.2, CM0.4 and CMD 1.3. Then, the CMDs were successfully grafted onto plasma aminated PTFE substrates. XPS confirmed for all CMD coatings a low amount of CMD present on the surface and similar chemical composition. However, biological results obtained suggested different structure of the coatings in solution depending on the DS. Firstly, the random

anchoring of CMD chains seemed to lead to a heterogeneous microstructure of the coatings. Then, the CMD chains in the CMD 0.2 coating would be more flexible than in the CMD 1.3. CMD 0.4 coating structure would be settled between the two others, and close to the CMD 0.2 structure. All CMD coatings improved the PTFE biological behavior. Nevertheless, the differences of structure influenced the biological response and CMD 0.2 coating exhibited higher anti-thrombogenic behavior, better HUVEC adhesion and in the same time avoided HUASMC adhesion. The results suggested the obtaining of a biomaterial with interesting properties towards the atherosclerotic treatment. These properties are expected to be further improved by the grafting of a dextran-rich copolymer in future works.

4.7. Acknowledgments

This work was supported by Inserm-FRSQ, FP7 european program PRESTIGE, the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Quebec Ministry for International Relations, the Centre Franco-Québecois de Coopération Universitaire, Centre d'Études et de Recherche sur les Matériaux Avancé (CERMA-ULaval) and the CHU de Québec. The authors would like to express their gratitude to Caroline Loy and Lucie Lévesque for their expertise and technical assistance, as well as the blood donor volunteers.

5. Carboxymethyl dextran and butyl methacrylate graft copolymers as non-adherent biomaterials

Eléonore C. Michel[1,2], Pascale Chevallier[1], Caroline Loy[1], Lucie Lévesque[1], Didier Letourneur[2] and Diego Mantovani[1]

[1]Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Dept. of Min-Met-Materials Eng., & University Hospital Research Center, Laval University. University Campus, PLT-1745G, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

[2]INSERM, U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Institut Galilée,Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse, France

Keywords: carboxymethyl dextran, poly(butyl methacrylate), synthesis, cell adhesion, stress relaxation, biomedical applications

Ce chapitre sera soumis dans Macromolecular Bioscience

5.1. Résumé

Dans cette partie du projet, l'influence du degré de substitution (DS) du carboxyméthyldextrane (CMD) et des ratios initiaux CMD/BMA (méthacrylate de butyle) sur le rendement de la copolymérisation ont été étudiés. Les compositions des copolymères obtenus sont déterminées par RMN, FTIR et CES après hydrolyse acide. Les rendements des synthèses bien que faibles apparaissent meilleurs avec un faible DS. Les copolymères obtenus sont principalement composés de PBMA avec des chaines 10 fois plus longues que celles du CMD. Des films sont obtenus par solubilisation dans le THF/eau (90/10) et sont caractérisés par XPS et essais mécaniques. La cytotoxicité des films, l'adhérence et la prolifération cellulaire sont évaluées. Les résultats montrent que la résistance mécanique est grandement améliorée malgré une faible proportion de CMD dans le copolymère, mais aussi que le PBMA apporte des propriétés anti-adhérentes, aucune cellule n'adhère. Ces propriétés ne semblent pas être influencées par le DS du CMD ou les ratios CMD/BMA. Ces copolymères apparaissent comme candidats prometteurs pour des revêtements non-adhérents en vue d'applications vasculaires.

5.2. Abstract

Anti-adhesive and low-fouling properties have an interest in biomedical applications to avoid non-specific protein and cell attachments. In this work, copolymers of carboxylmethyl dextran (CMD) and poly(butyl methacrylate) (PBMA) are successfully obtained by free radical copolymerization. The effects of CMD substitution degrees and CMD/BMA ratio on the copolymerization yields are investigated. Copolymers compositions are determined by ^{13}C-NMR, FTIR and by HPSEC after acidic hydrolysis, allowing differentiation between PBMA and CMD chains. The results indicate that copolymers are mainly made of PBMA chains that were 10-fold longer than CMD chains. Solubility properties in several solvents are investigated, and films obtained in THF/water (90:10) are characterized by XPS. Stress relaxation assays evidence flexible and ductile properties. Cell adhesion and proliferation studies with human endothelial cells and 3T3 fibroblasts show the absence of toxicity and a low cell adhesion capability. Therefore, these copolymers appear as promising elastic materials as non-cell adherent coatings for biomedical applications.

5.3. Introduction

The interactions occurring between the surface of the implants and the body components are crucial for the medical device success. Depending on the application, the device could be engineered to stimulate a favorable cell or tissue response, to enhance endothelialization.[61,87,124,163,164] On the opposite, it could be also designed to be non-adhesive in order to avoid adhesion of proteins and cells. Indeed, during surgery and after implantation, non-specific adhesion may occur and lead to issues such as thrombosis, immunological responses or infections.[12,165–167] To limit these complications, one approach is to produce biomaterials exhibiting anti-adhesive properties. To reach such surface properties, five major factors that rule cell repellence should be taken into account: surface free energy, electrostatic interactions, steric repulsion, hydration and topography.[41,43,168,169] Based on these surface parameters, a large number of polymers have been studied so far, for their applicability in biomedical field and especially towards cell and protein repellence. On the one hand, synthetic polymers, exhibiting smooth surface with low energy such as polyurethanes, poly(dimethyl siloxane), poly(tetrafluoroethylene), and poly(ethylene glycol) for its steric repulsion and hydration parameters, have been extensively studied and used as bioinert materials to develop cardiovascular devices, such as endovascular grafts or catheters.[18,165,166] On the other hand, natural polymers such as polysaccharides might also provide antifouling effects. In this case, these water-soluble polymers are mainly used as coatings covalently or ionically linked to the substrate, providing surfaces with steric repulsion, hydration and electrostatic interaction effects. Carboxymethyldextran (CMD) coatings are particularly interesting because they are known to inhibit non-specific cell and protein adhesion and were found efficient against adhesion of fibroblasts or endothelial cells.[51,52,103,104,149] However, one major disadvantage of polysaccharides is their rapid degradation in physiological environment leading to a decrease of their anti-adhesive efficiency, but also their low mechanical properties. To address these issues, studies were designed to explore the effect of mixing synthetic polymers already used in biomedical applications, and polysaccharides to provide materials exhibiting adequate biological and mechanical properties. Thereby, polysaccharides have been bond to oil, resin or plastic polymers such as polyacrylamides[134,170,171] polyacrylonitriles,[172,173] polyacrylates[126,129,130,174] by copolymerization, for diverse applications such as flocculants, bulk coatings or hydrogels. In particular, dextran derivatives copolymerized with acrylates have been extensively studied for hydrogel and scaffold fabrication for either drug delivery or tissue engineering applications.[110,124,125,141] Nevertheless, only a few studies have been conducted on dextran-acrylate based copolymers as possible thin film-coating for biomaterial applications.

Our approach consists in providing a novel copolymer based on the reaction of carboxymethyldextran with butyl methacrylate (BMA). Indeed, among synthetic polymers, the poly(butyl methacrylate) (PBMA) is particularly interesting because it has interesting biological and mechanical properties.[29,175,176] The use of both CMD and PBMA may lead to a copolymer that avoid bio-adhesion and also could sustain mechanical stress during manipulations or during the implantation.

The copolymerization has been thus made using a free radical reaction[133] that easily creates covalent bonds between hydrophilic and hydrophobic polymers. However, such reactions based on production of free radicals are difficult to fine-tune and may lead to many side reactions. To that end, our first challenge was to verify the feasibility of the synthesis and to understand the underlying mechanism of reaction. Then, the syntheses have been characterized by mass balance analyses at each step to study the influence on the copolymerization of the degree of substitution (DS) and CMD/BMA ratio. As a novel amphiphilic material, the copolymer solubility has been investigated and no common solvent has been found, making typical polymer characterization techniques inaccessible as liquid state proton NMR spectroscopy or size exclusion chromatography. However, our copolymers have been characterized in solid state by IR and solid state NMR. Films were produced in a mixture of THF/water and tested through tensile relaxation assay and cell adhesion assay.

5.4. Materials and Methods

5.4.1. Materials

Dextran (Mw ~70 kDa) was purchased from TCI Europe (Belgium). Butyl methacrylate (BMA) monomer (99%, d= 0.89 $g.mL^{-1}$, with 10 ppm monomethyl ether hydroquinone as inhibitor) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Stabilizers were removed by washing monomer (50 mL) successively with an aqueous solution (10 mL) of NaOH (50 $g.L^{-1}$) and NaCl (200 $g.L^{-1}$), then three times with deionized water (10 mL). Purified monomers were dried over anhydrous Mg_2SO_4 and stored under nitrogen at 10 °C before use. Ceric(IV) ammonium nitrate (99.5%) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium) and nitric acid (65%) from Chem-Lab (Zedelgem, Belgium). Monochloroacetic acid (Janssen Chimica, Belgium) and others chemicals were analytical reagents grades and used as received.

5.4.2. Graft copolymerization

Before copolymerization, two different carboxymethylated dextrans (CMDs) were synthesized from the native dextran with degrees of substitution (DS) of 0.2 and 0.4, as described in previous work[177], and referred in this work as CMD 0.2 and CMD 0.4, respectively.

The reactions were carried out in a 1 L flask equipped with a mechanical stirrer and a condenser, immersed in a 50 °C thermostatic water bath, under dry nitrogen atmosphere. CMD was dissolved in a 0.2 $mol.L^{-1}$ HNO_3 solution (995 mL) into the flask for 10 min. Then, 0.24 g of Ceric(IV) ammonium nitrate freshly dissolved in 5 mL of 0.2 $mol.L^{-1}$ HNO_3 were added to the medium using a syringe. Exactly 10 min later, 4 mL of BMA were added with a syringe and the mixture was left to react for 2 hours under stirring at 50 °C. After completion of

the reaction, the mixture was neutralized by addition of 10 mol.L^{-1} NaOH and concentrated up to 50 mL with a rotary evaporator at 50 °C. Polymeric macromolecules were recovered by precipitation in ice-cold ethanol (400 mL). After supernatant elimination, the remaining slurry was transferred into 50 mL centrifuge tubes.

Finally, four types of graft copolymers, CMD-PBMA 1, 2, 3 and 4, were synthesized with two degrees of substitution in CMD and two different weight ratios of CMD/BMA as shown in Table 18.

5.4.3. Extraction of homopolymer and mass balance determination

Ce(IV) ions and unreacted CMD were removed from the previous slurry by alternating vortex mixing and centrifugation washing steps. Briefly, after complete elimination of ethanol, the product was washed twice with 10^{-2} mol.L^{-1} EDTA (pH=4.8), to complex and remove ceric ions, and then four times with deionized water. After this first purification step, the copolymers were freeze-dried for 24 h and weighed (noted W_{C+H}).

To remove PBMA homopolymer by-products, the resulting products (2-3 g) were extracted with acetone overnight in a Soxhlet extractor. The pure copolymers were collected in 50 mL centrifuge tubes with 20 mL of acetone. After decantation, the copolymer formed a slurry at the bottom of the tube with an acetone supernatant. The copolymer was precipitated by alternating the addition of water droplets with vortex mixing. Remaining acetone was eliminated by washing with deionized water, as previously described, and the resulting product was once more freeze-dried and weighed (noted W_C). This procedure results in highly pure copolymers under the form of a fine white powder shape which is useful for further analyses. The yield for each copolymer synthesis was determined as the ratio of the pure graft copolymer weight (W_C) to the sum of BMA (w_{BMA}) and CMD (w_{CMD}) weights used for the synthesis. The content of PBMA homopolymer was also calculated as the ratio of the homopolymer weight (W_{C+H} - W_C) to the sum of homopolymer and copolymer weights (W_{C+H}).

5.4.4. Side chain separation

Grafted PBMA side chains were removed from the CMD backbone by acid hydrolysis. Briefly, CMD-PBMA (0.5 g) was placed into a flask with 50 mL glacial acetic acid. The flask was fitted with a condenser, placed in an oil bath at 110 °C. The mixture was refluxed for 1 h under stirring to allow the swelling of the grafted side chains. Then, 2 mL of perchloric acid (60%) was added dropwise and the mixture was immediately poured into ice water under vigorous agitation stirring to precipitate the PBMA side chains. The precipitate was recovered by filtration, washed with deionized water and dried at 50 °C under vacuum, weighted and analyzed using size exclusion chromatography (see section 5.4.6.3.).

5.4.5. Fabrication of films

5.4.5.1. Solubility

Solubility of the copolymers was investigated in various mixtures of water and organic solvents such as: dimethyl sulfoxide (DMSO), tetrahydrofuran (THF), acetone, chloroform and dioxane (Table 19). CMD-PBMA (50 $mg.mL^{-1}$) was dispersed in the solvent in a 15 mL centrifuge tube and placed under magnetic stirring for 1 h, at room temperature. Tubes were then centrifuged to assess the stability. The mixture presenting no phase separation between copolymers and solvent after centrifugation, was retained for the film fabrication.

5.4.5.2. Films

In order to perform the mechanical and biological assays, uniform films of the copolymers should be obtained. Thus, the four CMD-PBMA (50 $mg.mL^{-1}$) were dissolved in 4 mL of a mixture of THF and water (90/10 %v/v). The mixtures were then centrifuged at high speed for aggregation removal and the supernatant, a clean and homogeneous solution, was kept. This solution was then poured in PTFE molds and placed in an atmosphere saturated in THF in presence of $CaCl_2$, overnight. Then, the molds containing the copolymer films were placed under slight vacuum at 40 °C for at least 1 h. Films were gently unmold using tweezers and their thickness were measured with a caliper. For mechanical assay, a dumbbell-shaped mold was used and for biological assay, an evaporating dish.

5.4.6. Characterizations

5.4.6.1. Solid state nuclear magnetic resonance (^{13}C-NMR)

Spectra of CMD and CMD-PBMA graft copolymers powders were recorded at 400 MHz with a Bruker Avance spectrometer (Bruker Biospin, Milton, Ontario, Canada) equipped with a magic-angle spinning probe head. Spectra were acquired packing samples in 7-mm zirconia tubes and rotated at a frequency of 4 kHz, with a pulse length of 4.5 µs and a recycle delay of 4 s. 4800 scans were acquired for all samples.

5.4.6.2. Attenuated total reflectance Fourier-transform infra-red (FTIR)

The spectra of CMD, CMD-PBMA and PBMA homopolymer were recorded by using Attenuated Total Reflectance mode (ATR) on a Cary 660 FTIR (Agilent Technologies, Australia) spectrometer, equipped with a deuterated L-alanine-doped triglycine sulfate (DLa-TGS) detector and a Ge-coated KBr beam splitter. The measurements were recorded in the range 400-4000 cm^{-1}, at a resolution of 4 cm^{-1}, with at least 32 scans from

dried powder samples compressed into pellets. Baseline was corrected for all spectra and spectra were normalized to the PBMA carbonyl peak at 1724 cm^{-1}.

5.4.6.3. Molecular mass determination (HPSEC)

The molar mass of both CMD and ungrafted side chains of PBMA (see section 5.4.4) were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MiniDAWN TREOS, Wyatt Technology Inc.) and a differential refractive index detector (IOTA 2, Precision Instruments). For CMD analyses, the system was equipped with a Tosoh PWxl guard column and a Tosoh GMPWxl column (1-8000 kDa). Samples (20 $mg.mL^{-1}$) were eluted in $NaNO_3$-sodium azide (0.15 $mol.L^{-1}$ and 0.02 %w/v, respectively) filtered solution. For PBMA analyses, the system was equipped with a Tosoh TSKgel Hhr guard column and a Tosoh TSKgel G6000Hhr column (< 4.10^4 kDa). Samples (20 $mg.mL^{-1}$) were eluted in filtered acetone. The whole collected data: light scattering and differential refractive index were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar weights were calculated with dn/dc of 0.142 and 0.124 for CMD and PBMA, respectively, in relation with the mobile phase and its temperature.

5.4.6.4. Static contact angle (CA)

Measurements were performed on CMD-PBMA films and PBMA coatings (see section 5.4.8.1) using a VCA Optima XE system (AST Products Inc.). At least, five drops of deionized water (2 µL) per sample were randomly deposited and pictures were taken after 3 s. The angle value was taken as an average of the number of measures taken for right and left angles.

5.4.6.5. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Surface compositions of CMD-PBMA films and PBMA coatings were assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (PHI 5600-ci Spectrometer, Physical Electronics USA). Survey spectra were acquired at a detection angle of 45 ° using the Kα line of a standard aluminum X-ray source (1486.6 eV) operated at 200 W with charge neutralization, while high resolution spectra were obtained with a standard Mg X-ray source (1253.6 eV) at 150 W without charge neutralization. Detection was performed with a take-off angle of 45 ° on a 0.5 mm^2 area. The spectrometer work function was adjusted to give 285.0 eV for the main C (1s) peak. Curve fittings for high-resolution peaks were determined by means of the least squares minimization procedure employing Gaussian-Lorentzian functions and a Shirley-type background. At least, three measurements per

sample were made on three different samples to ascertain the homogeneity and the reproducibility of the surface chemistry.

5.4.7. Mechanical characterization

Mechanical tests were carried out on dumbbell-shaped CMD-PBMA films with a rectangular section (20 x 9 x 0.09-0.12 mm) with a 100 N load cell mounted on an Instron 5944 single column system section (Instron Corporation, Norwood, MA, USA) at room temperature. Herein, stepwise stress-relaxation tests followed by a tensile test until rupture were performed on each sample to assess its viscoelastic and elongation behaviors respectively. The stepwise stress-relaxation test consisted in stretching the sample at a 3% strain (10 $mm.min^{-1}$) and maintaining the strain constant for 1000 s while the stress decay was monitored. This process was performed repeatedly for each subsequent 3% strain until 27% of total strain. Then, samples were stretched continuously (10 $mm.min^{-1}$) until fracture. The stress was recorded on Bluehill 3 software (Instron Corporation). The resulting curve express the stress ($\sigma(t)$) as a function of time for a constant deformation (ε_0) (Figure 30). Curve fitting was performed on MatLab 2014 Software (MathWorks) using the Levenberg-Marquardt algorithm to provide the relaxation parameters. The CMD-PBMA copolymers stress response was established to fit a Maxwell–Wiechert model. At least, three samples were tested for each CMD-PBMA copolymer.

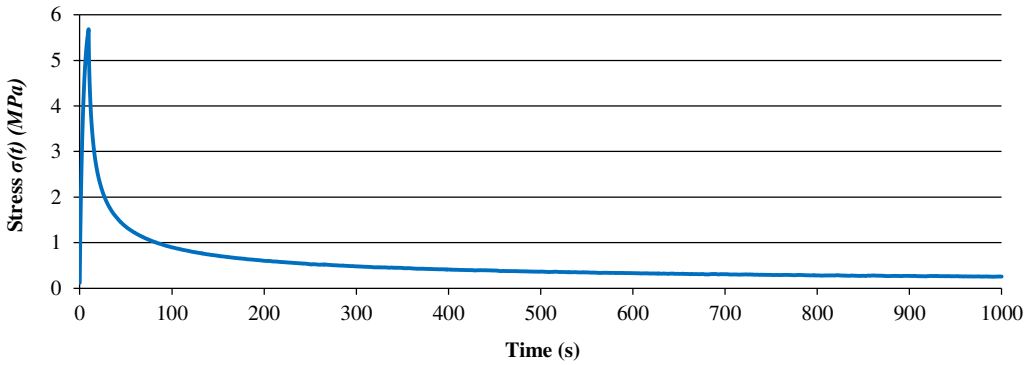


Figure 30: A typical stress curve versus time obtained with CMD-PBMA sample.

5.4.8. Biological assay

5.4.8.1. Samples preparations

For cell proliferation assays, CMD-PBMA films were punched in 12 mm-diameter disks that were fixed at the bottom of 24-well plates with Silastic medical adhesive (silicone, type a, Dow Corning Corporation, Auburn,

Michigan, USA). Plates were sterilized by immersion in 70% ethanol bath, and washed thereafter with sterile PBS solution.

Cover glass (diam. 12 mm, Fisherbrand) was used as a positive control. PBMA and Silicone were used as comparative controls. PBMA coatings were made from a solution of PBMA (M_w ~337 kg.mol^{-1}, Sigma-Aldrich) in THF (70 mg.mL^{-1}) by depositing 100 µL on a cover glass and placed under same conditioning as CMD-PBMA films. Silicone sheets (87315K72, McMaster-Carr) were punched and fixed as CMD-PBMA samples. All controls were sterilized with ethanol prior biological assay.

5.4.8.2. Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were isolated from an umbilical cord from normal-term pregnancies, kindly provided by the Saint François d'Assise Hospital, with the previous consent of donor mothers. To extract HUVECs, the vein was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS, Fair Lawn, New Jersey, USA), filled with trypsin 10x and incubated for 15 minutes at 37 °C. After trypsin removal, the cells were rinsed in PBS, the solution was then recovered and centrifuged at 1000 rpm during 5 min. The supernatant was removed and HUVECs were collected and cultured in a culture flask with M199 culture medium (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% of fetal bovin (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), Fibroblast Growth Factor-Basic (FGFb, 2ng/mL, Gibco), Epidermal Growth Factor (EGF, 0,5ng/mL, Invitrogen by Life Technologies, Grand Island, NY, USA), L-Ascorbic acid (1µg/mL, Sigma, St Louis, MO), Hydrocortisone (1µg/mL, Sigma), Heparin sodium salt, Grade I-A from porcine (90µg/mL, Sigma), Endothelial Cell Growth Supplement (ECGF, 1µg/mL, Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). This medium will be referred as EC medium thereafter. HUVECs at their third passage were used for the experiments.

NIH-3T3 mouse fibroblast cells line were cultured with DMEM (1x Gibco, 11995-065, Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 1% of Penicillin-Streptomycin. This medium will be referred as 3T3 medium thereafter.

HUVECs and 3T3 were collected from the culture flask by the addition of 1X trypsin-EDTA, after the removal of culture medium and rinsing with PBS. After trypsin inactivation with complete medium, the cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm. The resulting pellet was resuspended in the appropriate volume of medium. For both cytotoxicity and adhesion/proliferation assays, cells were seeded at 40 000 cells/cm^2 for HUVECs and 15 000 cells/cm^2 for 3T3 fibroblasts.

5.4.8.3. Cytoxicity

Cytotoxicity test was carried out by indirect contact. Briefly, this test consists to immerge samples in culture medium and incubate them during 1 and 7 days at 37 °C, and then culture cells with the resulting media. If any toxic elements have been released, the cells will be affected. According to the ISO 10993-5:2009 standard, surfaces were immerged in the desired medium as the ratio between the surface area and the medium volume was 3 cm^2/mL. The cytotoxicity assays are performed with the different CMD-PBMA, PBMA, silicone and glass substrates, and with HUVECs (40 000 cells/cm^2) as well as 3T3 fibroblasts (15 000 cells/cm^2). The HUVEC and 3T3 cells were seeded in 96-well-plates with 200 µL of their respective medium and pre-cultivated for 24 h to obtain optimal layer of cells. The medium was then replaced with extracts (200 µL) after rinsing with PBS. The cells were further incubated for 24 h and their viability was then assessed using resazurin test. Extract medium was replaced by 200 µL of resazurin solution in DMEM (1:10) and let cells metabolize it during 3 h (the oxidation of resazurin led to pink and highly fluorescent resorufin). 150 µL of each resazurin medium were taken and fluorescence was measured at 570 nm using a spectrophotometer ELISA reader (BioRad mod.450, Mississauga, Ontario, Canada). Results are the average of 6 measurements.

5.4.8.4. Cell adhesion and proliferation

HUVEC and 3T3 cell adhesion and proliferation were assessed on different CMD-PBMA films as well as on PBMA, silicone and glass samples. Substrates were prepared as described in section 5.4.8.1. Briefly, 75 µL of each cell suspension were deposited onto the surfaces to be tested, separately. Immediately after, the volume of the deposited cell suspensions was adjusted by addition of culture medium, to completely cover the material surface, then incubated at 37 °C for 2 h to allow appropriate cell adhesion. Samples were rinsed with the appropriate culture medium to remove any dead or poorly attached cells and samples were reincubated at 37 °C in presence of the appropriate culture medium. After 1, 4 and 7 days, the samples were rinsed with PBS and gently transferred in another 24-well plate to avoid potential bias from possible cells attached to the bottom of the wells. The resazurin assay was conducted as described earlier by adding 750 µL of the 10% resazurin solution in DMEM (1:10) per well and measured for fluorescence at 570nm. The solution was then removed and samples were rinsed 3 times with PBS and were then fixed for 20 min with formaldehyde 3.7% (750 µL). After 3 washing with PBS, cells were permeabilized with saponine (0.1%) and bovine serum albumin (3%) solution in PBS for 10 min. Samples were then immersed in a solution of DAPI (Sigma Aldrich, 32670) (1:3000) and rhodamin-phalloidin TRITC labeled (Sigma) (1:200) in PBS-BSA-Saponine solution for 1 h. Cells were rinsed three times with Tween 20™ (0.05%) in PBS and mounted with fluoromount. Images were recorded using a fluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus America Corp., Tokyo, Japan). Results were expressed as the mean of triplicate measurements.

5.5. Results and discussion

5.5.1. Copolymer and synthesis characterization

Graft copolymers of carboxymethyl dextran with butyl methacrylate (CMD-PBMA) were synthesized by radical polymerization using Ceric(IV) ions as radical initiator. As reported in Table 18, four types of sample were investigated using 2 degrees of substitution of the initial CMD and 2 mass ratio of CMD and BMA monomer. As expected for a radical copolymerization, relatively low yields in CMD-PBMA were obtained (Table 18) for all conditions, mostly because PBMA homopolymers formation competes with CMD-PBMA copolymers. Indeed, after the first step of purification in aqueous medium that eliminates unreacted water-soluble CMD and ceric ions, the resulting product contained the copolymer of CMD-PBMA and a large quantity of homopolymer of PBMA (44 to 70 %). The homopolymer was then eliminated by extraction. Note that yields of pure CMD-PBMA made from CMD 0.2 were higher than with CMD 0.4, regardless the ratio CMD/BMA initially used.

Table 18: Mass balance of the graft copolymerization synthesis in terms of yield and homopolymer content for the 4 initial conditions used.

		Synthesis			HPSEC[e]	
					CMD	gPBMA
Copolymers	**DS_{CMD}[a]**	**w_{CMD}/w_{BMA} (g/g)[b]**	**Yield (%)[c]**	**hPBMA (%)[d]**	**M_n ($kg.mol^{-1}$)**	**M_n ($kg.mol^{-1}$)**
CMD-PBMA 1	0.2	0.07	39 ± 9	44 ± 9	51	600 – 900
CMD-PBMA 2	0.4	0.07	18 ± 4	70 ± 7	58	600 – 700
CMD-PBMA 3	0.2	0.30	35 ± 3	68 ± 4	51	600 – 900
CMD-PBMA 4	0.4	0.30	30 ± 2	60 ± 10	58	600 – 700

Synthesis in 1 L of HNO_3 (0.2 $mol.L^{-1}$), under dry N_2 atmosphere for 2 h in presence of 0.24 g of ceric ammonium nitrate. Results were obtained from at least n=4 syntheses.

[a] Degree of substitution (DS) of CMD 0.2 and CMD 0.4 previously determined by ^{1}H-NMR.[177]

[b] Initial weight ratio of CMD (w_{CMD}) and BMA (w_{BMA}) monomers used for the copolymerization.

[c] Yield of the synthesis defined as the weight of copolymer on the weight of initial CMD and BMA and calculated as follows : $W_C / (w_{CMD} + w_{BMA})$

[d] Homopolymer (hPBMA) content formed during the synthesis, determined with the mass loss during Soxhlet extraction, calculated as: $(W_{C+H} - W_C) / W_{C+H}$

[e] Number average molar mass determined by HPSEC of CMD before copolymerization and ungrafted PBMA (gPBMA) chains from copolymers.

The formation of the resulting copolymers was confirmed by ATR-FTIR and solid state ^{13}C-NMR. Figure 31 displays the ATR-FTIR spectra of all 4 CMD-PBMA showing characteristic peaks of PBMA homopolymer, such as stretching vibration of carbonyl (C=O) of the acrylate group at 1724 cm^{-1}, as well as the large band of the hydroxyl (3440 cm^{-1}) vibration from the CMD. The CMD carboxylate C=O vibration were also present on the CMD-PBMA spectra at 1590 cm^{-1}, and their intensity increased with the DS.

Solid state ^{13}C-NMR spectra of all CMD-PBMA were similar as well as spectra of both CMD 0.2 and CMD 0.4. Figure 32 displays a representative ^{13}C-NMR spectrum of each copolymer. PBMA characteristic peaks are clearly evidenced on the CMD-PBMA spectrum with the C=O chemical shift at 178 ppm (d) and the others carbons of PBMA at 10-65 ppm (a-c, e-h). Furthermore, signal of the carbon on the anomeric position in CMD is observed at 98 ppm (1) and the large peak of carbons 2-7 at 73 ppm. Also, on the CMD spectra, carbon of C=O is hardly detected at 178 ppm (8) and C1'at 125 ppm (1'), which is the chemical shift of C1 when the carboxymethyl group is on position 2. Both NMR and FTIR investigations suggest a high content of PBMA in the copolymers CMD-PBMA, due to very low intensity of characteristic peaks of CMD compared to PBMA ones.

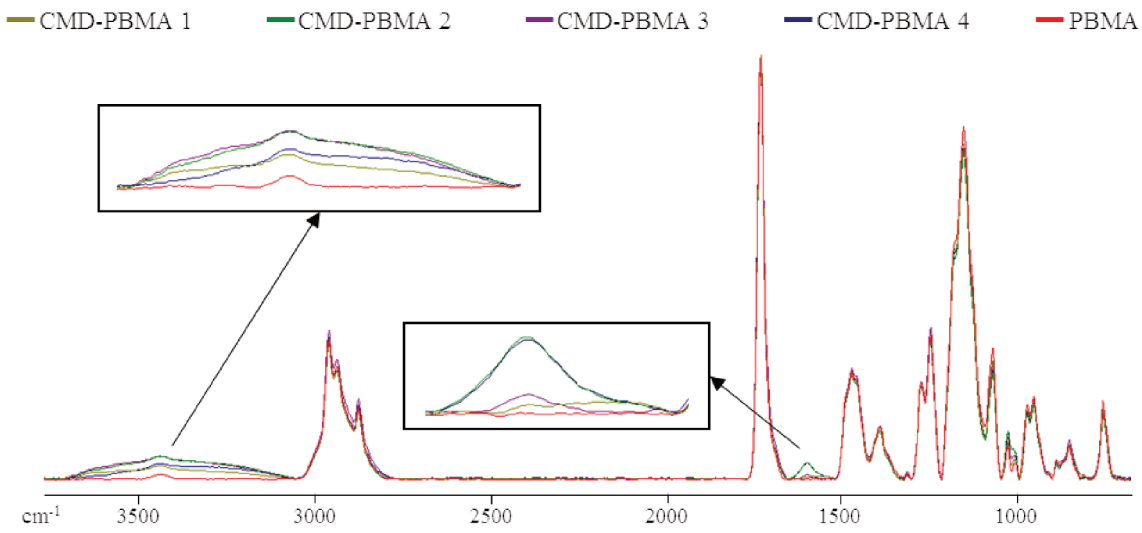


Figure 31: FTIR spectra of homopolymer of PBMA (red) and of the 4 copolymers synthesized: CMD-PBMA 1 (olive), CMD-PBMA 2 (green), CMD-PBMA 3 (purple) and CMD-PBMA 4 (blue). Spectra were normalized to the characteristic band of C=O vibration from acrylate at 1724 cm^{-1}.

To further investigate copolymer compositions, HPSEC analyses were carried out (Table 18). Prior to copolymerization, results obtained with CMD exhibited average molar masses of 50 kg.mol^{-1} for native dextran, 51 kg.mol^{-1} for CMD 0.2, and 58 kg.mol^{-1} for CMD 0.4. Furthermore, the masses obtained were similar to the expected masses calculated from DS obtained in ^{1}H-NMR. After acid hydrolysis, PBMA chains separated from polysaccharides backbone were recovered and also analyzed in HPSEC and ^{1}H-NMR (data not shown). A preliminary study on a commercial PBMA in the same hydrolysis conditions showed that no hydrolysis of the PBMA chains occurred. PBMA side chains of the copolymers were found to be 10-fold longer than CMD ones.

No difference was found between the 4 copolymers, and molar masses of ungrafted PBMA were of 600-800 kg.mol^{-1} in average. The high variation observed in ungrafted PBMA chains lengths may be related to the instability of the radicals involved in the copolymerization reaction and the emulsion process. Ungrafted PBMA chains were also weighted and represent 80-95% of the weight of the resulting copolymers, for all conditions. This confirms the observation made by FTIR and ^{13}C-NMR analyses, showing that the copolymers were mainly made of PBMA compared to CMD.

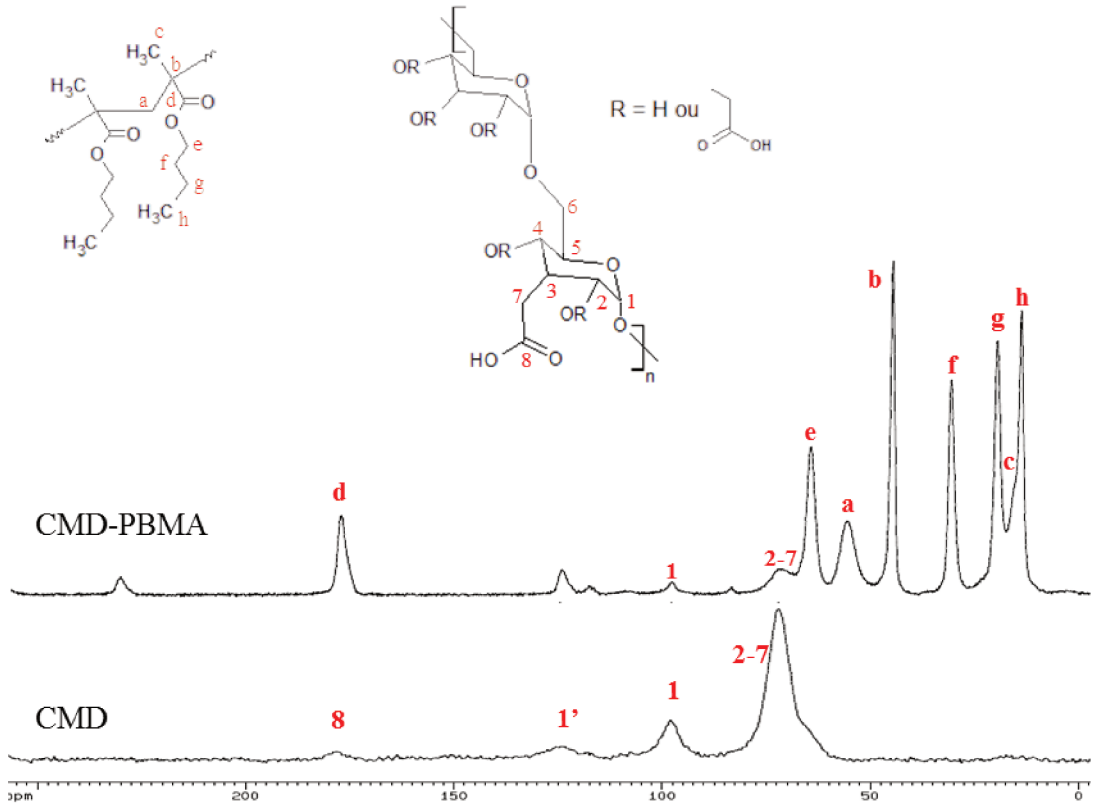


Figure 32: Solid state ^{13}C-NMR spectra of CMD and CMD-PBMA copolymer. CMD spectrum is representative of both CMD 0.2 and CMD 0.4. CMD-PBMA spectrum is representative of the four copolymers CMD-PBMA 1, 2, 3 and 4 (Table 18).

5.5.2. Reaction scheme

The copolymerization reaction scheme is a key parameter regarding the final copolymers compositions. Several articles have been published on the graft copolymerization mechanism of vinyl monomers onto polysaccharides. For all the proposed mechanisms, the principle of radical copolymerization with ceric ions initiator remains the same: the formation of a free radical via a redox reaction in which Ce^{4+} is reduced to Ce^{3+} ions and a proton is released (Figure 33.a and b). The location of the free radical will determine, inter alia, the position of grafted PBMA chains on the CMD backbone. Literature reports that the free radicals are mainly formed on the

polysaccharide chain. To that end, three possible sites are considered: the hemiacetal of the reducing end-point,[172,178,179] glycols,[180,181] and hydroxyls (Figure 33.b).[134,182] The end-point hemiacetal is in constant equilibrium with the aldehyde form, giving to the terminal unit high reducing properties. Therefore, the terminal aldehyde is much more reactive than glycols and hydroxyls to oxidants,[170] and thus favored for free radical formation. To investigate if the terminal aldehyde (HCO) is the only site for radical formation, it has been reduced into alcohol (OH) on CMD chains and copolymerizations were carried out under the same conditions as CMD-PBMA 3 and 4 (higher CMD/BMA ratio). Even with the aldehyde blocked, the copolymerization occurred and the resulting copolymers presented similar compositions as CMD-PBMA 3 and 4 (data not shown). Hence, the reducing end-point (HCO) is not the only active site for radical formation and when blocked, radical formation occurred on other sites. Besides, glycols and OH are much more numerous than the HCO, which is only one per CMD chain, so stands a number-reactivity competition. Hydroxyls in position 2 are known to be more reactive than the other hydroxyls on the dextran unit,[183] and the low yields observed previously for CMD-PBMA 2 and 4 made from CMD 0.4 compared to CMD 0.2, might be explained by the lower availability of this position due to carboxymethylation and suggest that OH and HCO sites compete for radical formation.

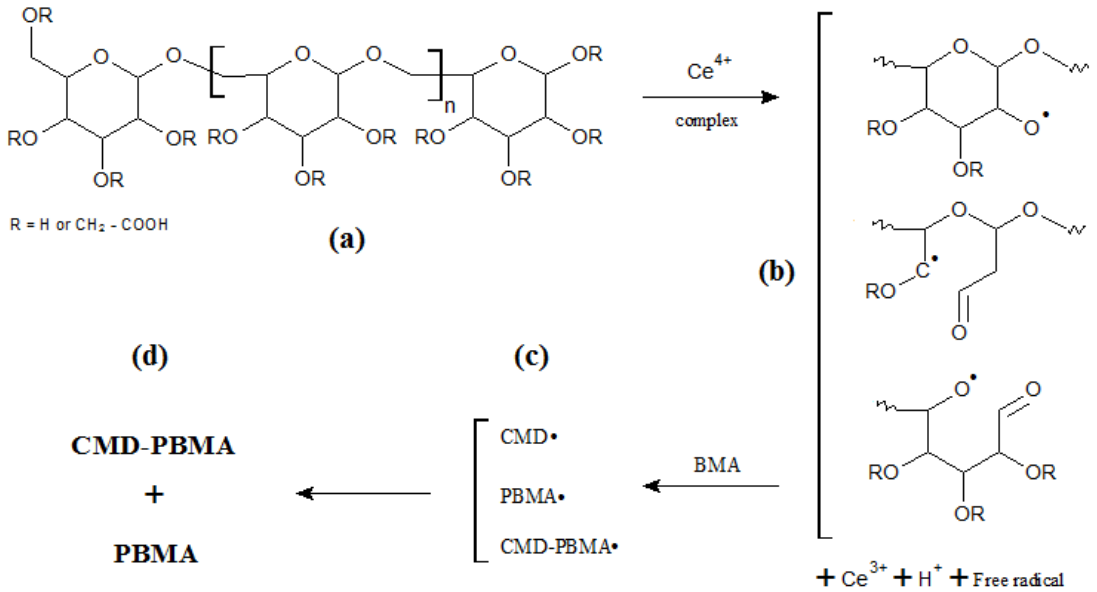


Figure 33: Suggested reaction scheme for CMD-PBMA copolymerization. Reaction between CMD chains and ceric ions (a) creates radicals on CMD chains in 3 different sites (hydroxyl, glycol, hemiacetal) and free radicals in solution (b). Radicals react with BMA monomers to produce macroradicals of growing homopolymer chains (c) and their recombination end forming majorly copolymer CMD-PBMA and homopolymer of PBMA (d).

After determining the possible location of the radical on the CMD chains, it is of interest to understand how PBMA chains were polymerized and grafted to CMD (Figure 33.c). The most common mechanism described in the literature [129,173,179,181,184] suggests that the free radical formed on the polysaccharide chain reacts with the

vinyl function of the monomer (M) and create the chain reaction for propagation, then termination occurs by recombination, as seen below:

Initiation: Polysaccharide + Ce^{4+} → Polysaccharide• + Ce^{3+} + H^+

Polysaccharide• + M → Polysaccharide – M•

Propagation: Polysaccharide – M• + n M → Polysaccharide – M_{n+1}•

Termination: Polysaccharide – M_p• + Polysaccharide – M_m• → Polysaccharide – M_{p+m}

This mechanism suggests high frequency of grafting and short PBMA chains. However, average calculations from ungrafted PBMA molar masses and copolymers weights suggest a low frequency of PBMA grafting on CMD chains which would be 1 or 2 PBMA chains per one CMD chain. Besides, HPSEC analyses (data not shown) demonstrated that PBMA homopolymer chains and ungrafted PBMA side chains exhibit similar average molar masses. These observations are in good agreement with the mechanism proposed by Gaylord et al., considering that graft copolymerization occurs mainly by the termination of growing homopolymer on the polysaccharide backbone.[172,178,185–187] Ceric ions may create free radicals present in the solution that would initiate the homopolymerization.[188] The resulting mechanism would be thus as follows:

Initiation: Polysaccharide + Ce^{4+} → Polysaccharide• + Ce^{3+} + H^+

Free radical• + M → M•

Propagation: M• + n M → M_{n+1}•

Termination: M_{n+1}• + Polysaccharide• → Polysaccharide – M_{n+1}

Both mechanisms may occur (Figure 33). However, CMD-PBMA copolymers are suggested to be mainly the result of the growing PBMA chains termination on the hemiacetal or hydroxyl (position 2) of the CMD chain, resulting in a block copolymer structure rather than a comb structure.

5.5.3. Solubility and films of copolymers

CMD-PBMA copolymers solubility was investigated in order to produce polymeric films. As seen previously, CMD-PBMA are mainly made of PBMA chains. Therefore, known solvents of PBMA were firstly tested and then other available organic solvents were also assessed. Due to the hydrophilic CMD chains in the copolymers structure, mixture of organic solvents with water in different ratio was also tested (Table 19). No solvents were found to dissolve both CMD and PBMA chains. CMD-PBMA 1, 2, 3 and 4 were found to behave similarly in the tested solvents and mixtures. However, a swelling of chains was observed in THF, acetone, chloroform and dioxane but in mixtures of these solvents with water, the copolymers remained insoluble excepted for THF. Indeed, when 10% of water was added to THF, copolymers also swelled. The resulting slurry of copolymers in

solvents and mixtures of solvents all appeared as colloidal suspensions. Nevertheless, after centrifugation, only THF/water 90:10 presented no phase separation between the slurry of copolymer and the solvent. CMD-PBMA formed a colloidal dispersion only in that mixture.

Table 19: Behavior of the copolymers in various solvents.

Solvent/water (%v/v)	DMSO	THF	Acetone	Chloroform	Dioxane	Water
100/0	-	S	S	S	S	-
90/10	-	D	-	-	-	-
80/20	-	-	-	-	-	-

Copolymer concentration was 50 $mg.mL^{-1}$. S: Swelling, D: Dispersion, -: Insoluble.

CMD-PBMA films were made and their chemical compositions determined using XPS analysis (Table 20). PBMA alone was also analyzed for comparison. Our results show no significant differences between each copolymers and chemical compositions were similar to PBMA with a carbon-oxygen ratio around 4. Indeed, considering the low quantity of CMD in the copolymer and the similar composition of CMD and PBMA in terms of chemical bonds and elements, no differences were thus detected both in survey composition as well as in high resolution spectra of C1s and O1s.

Nevertheless, the addition of CMD to PBMA in the copolymer decreased the hydrophobicity of the surfaces, exhibiting contacts angle from 88 to 80-84 °. This suggests that the CMD chains were exposed at the surface even if no differences were observed in XPS analysis.

Table 20: XPS characterizations and contact angles of CMD-PBMA films and PBMA coating.

Film	%C	%O	C/O	CA (°)
CMD-PBMA	**[285.0 eV: C-C/C-H]**	**[532.0 eV: C=O[a]]**		
	(286.5 eV: C-O)	**(533.4 eV: O-C)**		
	{288.8 eV: C=O[a]}			
1	80 ± 0.4	20 ± 0.4	4.1 ± 0.1	84 ± 3
	[59 ± 2]	[10 ± 0.9]		
	(13 ± 2)	(10 ± 0.6)		
	{8 ± 0.8}			
2	79 ± 1	21 ± 1	3.9 ± 0.3	80 ± 1
	[57± 3]	[10 ± 2]		
	(14 ± 2)	(11 ± 1)		
	{8 ± 0.3}			
3	80 ± 3	20 ± 3	4.0 ± 0.6	82 ± 3
	[61 ± 5]	[10 ± 2]		
	(12 ± 2)	(10 ± 1)		
	{7 ± 2}			
4	78 ± 2	22 ± 2	3.5 ± 0.4	82 ± 2
	[59 ± 4]	[12 ± 3]		
	(11 ± 2)	(10 ± 1)		
	{8 ± 0.4}			
PBMA	80 ± 0.5	20 ± 0.5	3.9 ± 0.1	88 ± 2
	[58 ± 2]	[9 ± 0.7]		
	(13 ± 2)	(11 ± 0.4)		
	{9 ± 0.4}			

[a] C=O bonds represent both acrylate and carboxylic acid carbonyl. CA: contact angle.

5.5.4. Mechanical properties

Mechanical behavior of the CMD-PBMA copolymers were investigated with stepwise stress-relaxation and tensile tests. For small deformations, the copolymer stress relaxation observed can be correlated to a linear viscoelastic behavior due to the ability of polymer chains to reorganize.[189,190] By using the current model described in experimental part, at infinite time only the spring contributes to the stress response meaning only the elastic part of the copolymer, and the elastic moduli ($E_{0,i}$) was determined for each relaxation step (i). Therefore, for each copolymer, the stress at infinite time ($\sigma_{0,i} = E_{0,i}\varepsilon_{0,i}$) of each successive relaxation assay (i) at constant deformation ($\varepsilon_{0,i}$), was reported on a stress-strain curve ($\sigma_{0,i}(\varepsilon_{0,i})$) in function of each $\varepsilon_{0,i}$ and a linear regression has been processed. The resulting slope corresponds to the linear modulus (E_L) of the copolymer (Table 21). CMD-PBMA copolymers appeared to be flexible and presented similar linear moduli of 1.5-2 MPa.

Furthermore, copolymers appeared as ductile materials, with the capacity to deform up to 60-100% of their initial length before rupture. CMD-PBMA 1 showed a higher elongation to rupture (e_r = 1.1) compared to the others (e_r = 0.6). Strain to rupture measurements have been performed only on clean-cut fractures and not on eventual film defects. However, elongation responses strongly depend on the film fabrication and test conditions, which may explain the higher deformation sustained by CMD-PBMA 1. It should also be noticed that copolymers films recovered their initial dimensions 12h after testing.

Results evidenced an improvement of mechanical behavior, in terms of flexibility and ductility for the copolymers compared to PBMA. Indeed, PBMA films processed in the same conditions appeared to be too brittle to be removed from their mold, therefore no tensile test could have been performed. In the copolymers, the flexibility is highly improved compared to PBMA. For comparison, a PBMA film with a thickness of hundreds of nanometers presented a Young modulus of 1 270 MPa measured by nanoindentation.[191] Furthermore, the mechanical behavior of the copolymers could be compared to silicone rubber, a widely used material in biomedical applications, which can present a Young modulus of 1-5 MPa and elongation between 100-800%.[192,193]

Table 21: Linear modulus (E_L) and elongation to rupture (e_r) of CMD-PBMA films determined from stress-relaxation assays. Stress-relaxation assays were successively performed at a constant deformation of 3% until 27% of total deformation and then constant traction was applied until rupture (10 mm.min^{-1}), at room temperature. e_r is defined as the ratio between changed in length and initial length. Mechanical assays were performed on dumbbell-shaped films with a rectangular section of 20x9x0.09-0.12 mm. Results are the means of at least 3 assays.

CMD-PBMA	E_L (MPa)	e_r
1	2 ± 0.6	1 ± 0.1
2	1.5 ± 0.03	0.6 ± 0.06
3	2 ± 0.1	0.6 ± 0.05
4	2 ± 0.3	0.6 ± 0.04
PBMA	Too brittle to be removed from the mold	

5.5.5. Biological performances

The biological properties of the copolymer films have been evaluated towards human fibroblast and endothelial cells. As seen previously, all copolymers exhibited similar chemical composition after XPS analyses and similar contact angles. Therefore, only CMD-PBMA 3 and 4 were selected for biological testing as they were synthesized with the higher ratio of CMD/BMA and the two different DS of 0.2 and 0.4, CMD-PBMA 3 and 4, respectively. Hence, the influence of the CMD content and the DS in the copolymer have been investigated towards cell adhesion and put in comparison with PBMA, as well with silicone as a control.

Prior adhesion, cytotoxicity of sample extracts has been investigated on HUVECs and 3T3 fibroblasts. As shown in Figure 34, copolymers samples as well as PBMA and silicone controls presented cell viability higher than 80% for both HUVEC and 3T3 cells and for all extraction times (1 and 7 days). Results were expressed as a percentage of viability of cells cultivated with medium which was in contact with glass cover-slip, known as a non-cytotoxic control, during 1 and 7 days. According to ISO 10933-5, a reduction of cell viability by less than 20% is considered a non-cytotoxic effect. Hence, no cytotoxicity has been presented by the copolymers samples neither by the PBMA and silicon controls.

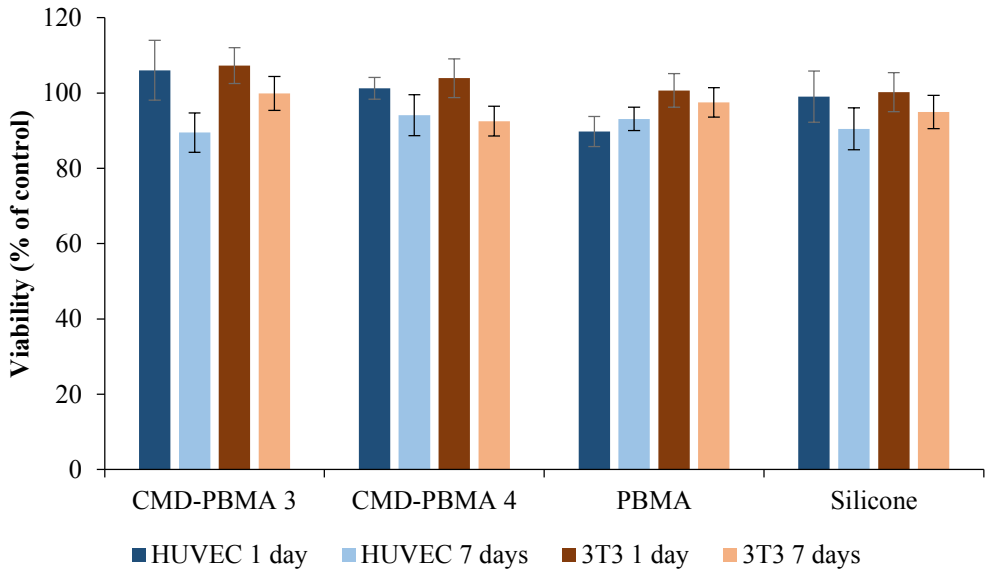


Figure 34: Cytotoxicity assay by resazurin absorbance after 1 and 7 days of extraction medium. Cell viability after 24 h of culture expressed as a percentage of the viability of cells in the control: cells cultivated with extracted medium from glass cover-slip immersion. The dashed line shows 80% cell viability (viability > 80%: no cytotoxicity).

Adhesion and proliferation of HUVECs and 3T3 fibroblasts were then investigated on CMD-PBMA 3 and CMD-PBMA 4 as well as on PBMA and silicone as polymeric controls and on glass, as a positive control. Cell adhesion (Figure 35 and Figure 36) on all samples was low (2%) as compared to glass for both HUVEC and 3T3 cells, and at all times (1, 4 and 7 days). This means that none or very few cells were found on copolymers as well as on PBMA and silicone.

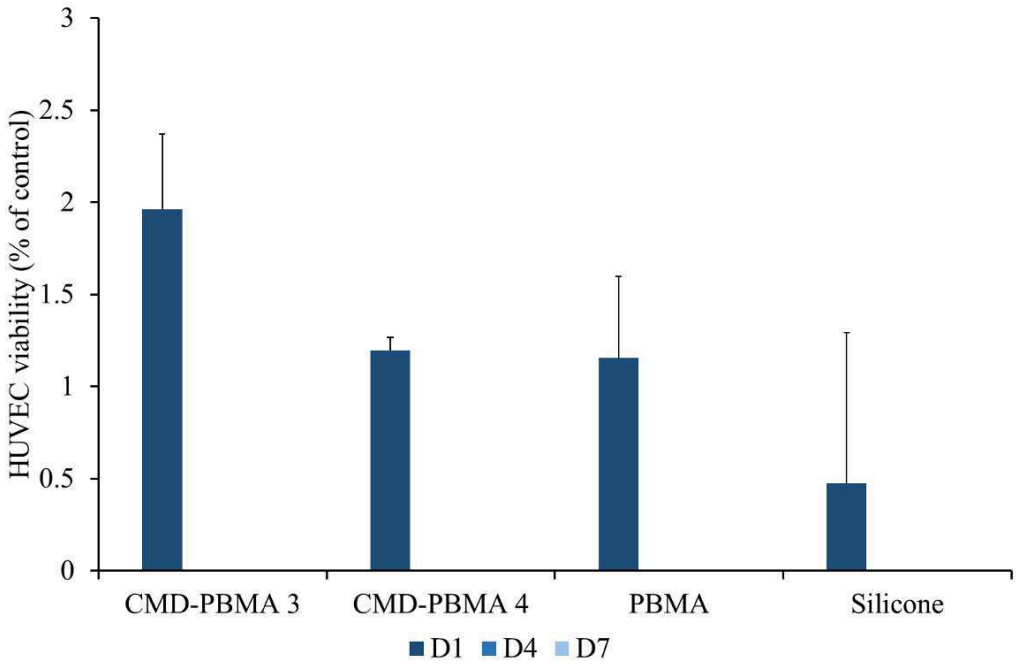


Figure 35: HUVEC after 1, 4 and 7 days of culture (D1, D4 and D7) on polymeric surfaces. Cell adhesion expressed as a percentage of cells versus the control on glass.

Low HUVEC adhesion has been observed after 1 day of contact between cells and surfaces for all samples (Figure 35). This suggests that HUVECs poorly attached and did not proliferate. No significant differences were found between copolymers and PBMA and silicone. Fluorescence microscopy micrographs have been taken (Figure 37). HUVECs were mostly found in islets. An example of islets is showed on Figure 37 and presented not well-spread cells with damaged nuclei, enable to further proliferate (no cells observed at day 4 and 7 on Figure 35), whereas on glass cells were well-spread at day 1 and proliferation has been observed at day 4 and 7. CMD-PBMA 3, CMD-PBMA 4, PBMA and silicone only presented remains of cells at day 4 and 7.

As for 3T3 fibroblasts, no cell adhesion on copolymers has been observed after day 1 (Figure 36). Fluorescence images exhibited some round-shaped cells attached at day 1 for all samples (data not shown). Furthermore, at day 4 and 7, it can be observed that fibroblasts formed clusters of different sizes on copolymers (Figure 37). It is suggested that few cells attached after 1 day but expressed a very low metabolic activity related to a surviving state, which explains that no adhesion has been observed in the resazurine assay. Then, due the inappropriate surfaces provided by copolymers, and with enough time, fibroblasts could aggregate in clusters to survive with a filaments network, in which they may be able to slightly proliferate for a while and then die. This explains the viability and the high variations observed on day 4 and 7 for CMD-PBMA 3 and 4. For the silicon and PBMA controls, no cells or not well-spread and isolated ones have been observed on day 4 and 7, whereas on glass control cells growth occurred until forming a layer on day 7.

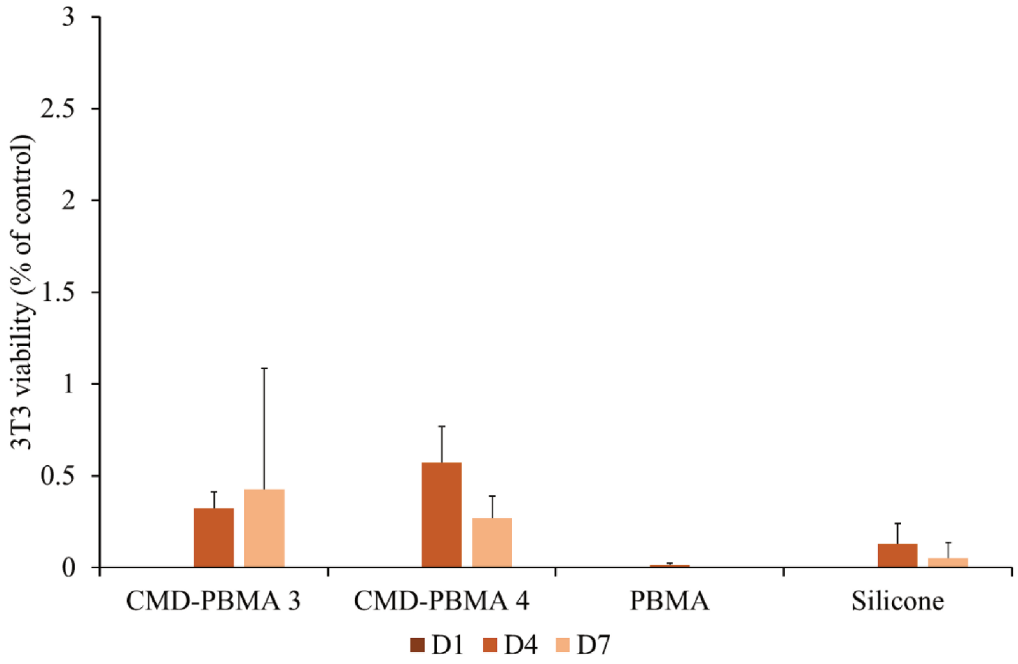


Figure 36: 3T3 fibroblasts presence after 1, 4 and 7 days of culture (D1, D4 and D7) on polymeric surfaces. Cell adhesion expressed as a percentage of cells versus the control on glass.

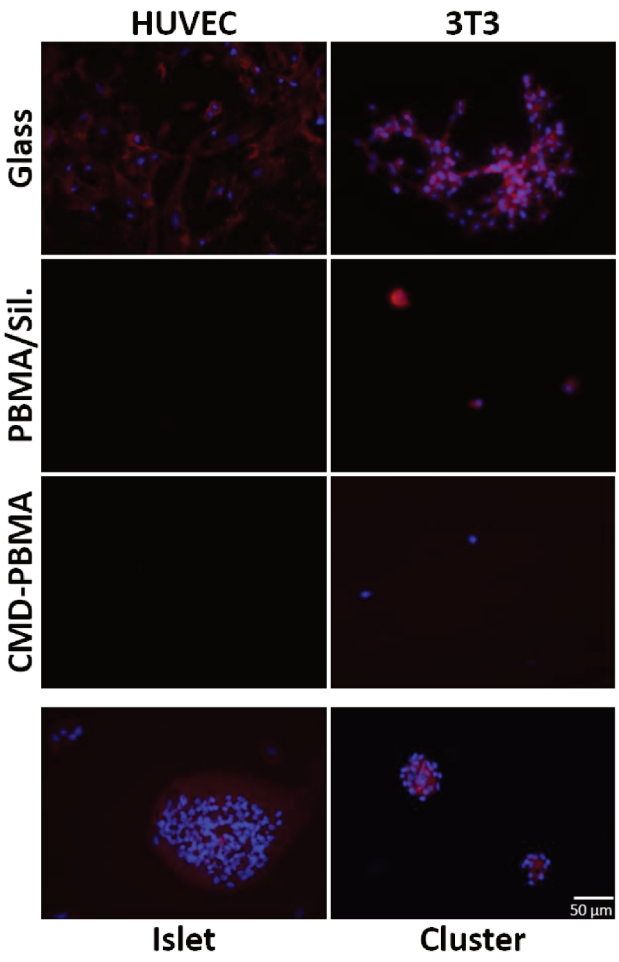


Figure 37: Fluorescent micrographs of HUVEC (left panel) and 3T3 cells (right panel) after 4 days of culture. From top: Representative micrographs of Glass, both PBMA and Silicone (Sil.) and CMD-PBMA 3 and 4 (CMD-PBMA). Bottom: HUVEC islets at day 1 and fibroblast clusters on polymeric surfaces. Nuclei are stained with DAPI (blue) and cell cytoskeleton (actin filaments) with rhodamine-phalloïdine (red). Magnification x 20.

5.6. Conclusions

Copolymers of CMD-PBMA obtained from CMD with a DS of 0.2 and 0.4 and with two different ratios of CMD/BMA, 0.07 and 0.3 (w/w), were successfully synthesized. The increase of the degree of substitution from 0.2 to 0.4 seemed to hindrance the copolymerization reaction and higher CMD/BMA ratio increase the yield of the synthesis, which is related to reaction kinetics. CMD-PBMA copolymers characterized by ATR-FTIR, ^{13}C-NMR and XPS exhibited similar compositions for all conditions with 80-95 % of PBMA in weight. Furthermore, side grafted PBMA chains are 10-fold longer than CMD, as evidenced by HPSEC, and are grafted

to CMD backbone with a low frequency, thus leading to a block copolymer structure. The mechanism could therefore implies the termination of growing PBMA homopolymer chains on CMD backbone. Despite the small content of CMD in the copolymer films, the contact angles were decreased and the mechanical properties were significantly improved compared to PBMA homopolymer. Indeed, CMD-PBMA films appeared flexible and ductile able to deform up to 100% of deformation. CMD-PBMA films presented non-cytotoxic and anti-cell adhesive properties, since fibroblasts or endothelial cells did not adhered. The degree of substitution in CMD had no influence on the biological behavior of the copolymers. Finally, the mechanical and anti-cell adhesive properties make the CMD-PBMA copolymers as interesting candidates for medical devices, such as for coating of catheters.

5.7. Acknowledgments

This work was supported by Inserm-FRSQ, FP7 European FP7 program PRESTIGE, the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Quebec Ministry for International Relations, the Centre Franco-Québecois de Coopération Universitaire, Centre d'Études et de Recherche sur les Matériaux Avancés (CERMA-ULaval), the CHU de Québec Research Center, the Centre Franco-Québecois de Coopération Universitaire, and the Research Center of CHU de Québec. The authors would like to express their gratitude to Pierre Saboural, Angélika Kroshko, Bernard Drouin, Pierre Audet and René C.-Gaudreault for their expertise and technical support, as well to all donors of cords.

6. Discussion générale

Ce travail s'est articulé autour de plusieurs modifications du dextrane permettant d'obtenir différents matériaux comme des revêtements de CMD greffés à des surfaces fluorocarbonées préalablement aminées, puis des films de copolymères synthétisés à partir de CMD. Ce chapitre donne une vue d'ensemble sur le travail effectué et revient sur les résultats importants obtenus tout au long de ce projet. La discussion met l'emphase sur les méthodologies et les techniques développées ainsi que les défis rencontrés. Finalement, celle-ci permet de mettre en relation les travaux présentés dans les chapitres 3, 4 et 5, et propose les perspectives et travaux futurs envisagés.

6.1. Le greffage du dextrane

Un des objectifs de ce travail était de former des revêtements stables à long terme. Pour ce faire, la stratégie adoptée était d'augmenter l'adhérence au substrat par la formation de liens covalents entre le revêtement polymérique et la surface. Plusieurs approches sont possibles et celle utilisée pour ce projet était de fonctionnaliser la surface avec des amines (NH_2) puis d'activer le dextrane afin qu'il puisse réagir avec ces amines. Le **chapitre 3** présente les deux voies d'activation du dextrane envisagée par l'introduction de groupements réactifs sur la chaîne de polymère : des aldéhydes par oxydation au périodate, donnant l'OxD, et des groupes carboxyles (COOH) par carboxyméthylation, donnant le CMD. Pour la suite du projet, l'activation par carboxyméthylation a été retenue. Dès ce premier chapitre, la chimie des carbodiimides est utilisée afin de faire réagir les COOH du CMD avec les NH_2 de la surface. Dans le **chapitre 4**, le greffage des CMD à la surface aminée est optimisé et se fait par cette réaction.

Ce chapitre présente la démarche scientifique adoptée quant à l'optimisation à la fois de la modification et du greffage du dextrane dans l'optique de fabrication de revêtement de copolymères dextrane-PBMA.

6.1.1. La modification du dextrane : un compromis entre greffage et copolymérisation

L'objectif final de ce projet était d'étudier les possibilités de greffage de copolymères de dextrane-PBMA à des surfaces aminées et d'en étudier les propriétés biologiques et mécaniques. La stratégie envisagée était d'activer la chaîne de dextrane, en premier lieu, afin de permettre la formation de liens covalents avec la surface aminée, puis de synthétiser le copolymère à partir de ce dextrane modifié. **La voie de synthèse du dextrane modifié et le taux de modification apporté devraient permettre le greffage du dextrane sans pour autant empêcher ou altérer la copolymérisation ultérieure avec les monomères de BMA.** Une modification minimale du

dextrane était alors souhaitée, afin de conserver un maximum les paramètres de copolymérisation et les propriétés des copolymères synthétisés. Par la suite, le copolymère synthétisé à partir du dextrane ainsi modifié présenterait quelques points d'ancrage avec la surface aminée, jugés suffisants vis-à-vis des masses molaires considérées (50 $kg.mol^{-1}$ pour le dextrane et 600-900 $kg.mol^{-1}$ pour les chaînes de PBMA greffées) pour en améliorer la stabilité.

Le **chapitre 3** montre que le dextrane a été modifié par oxydation et carboxyméthylation. Le dextrane oxydé (OxD) présente des groupements aldéhydes qui peuvent réagir avec les amines de la surface et le dextrane carboxyméthylé (CMD) possède des groupements carboxyles. Les OxD et CMD synthétisés possèdent un faible taux de modification : un degré d'oxydation de 20% et 40% pour l'OxD, et un degré de substitution de 25% et 50% pour le CMD. Pour les deux types de polymères le taux de modification s'est avéré suffisant pour permettre le greffage. Toutefois, le CMD a été choisi pour la suite du projet car cette modification **1) offrait un bon contrôle du degré de substitution, 2) permettait le greffage à faible degré de modification, 3) conservait la structure polysaccharide** contrairement à l'OxD qui présentait une ouverture de cycles. Ce dernier point est pertinent essentiellement pour éviter d'altérer la synthèse et les propriétés du copolymère par la suite mais aussi car les propriétés biologiques du dextrane dépendent fortement de sa structure.

Par la suite, le **chapitre 4** présente un bon contrôle de la synthèse du CMD par l'optimisation des paramètres de synthèse, de la purification ainsi qu'une caractérisation approfondie du polymère. Un bon contrôle du degré de substitution a été démontré par RMN-^{1}H et titration, techniques permettant le calcul direct du DS, ainsi que par ATR-FTIR et SEC, qui permettent de corréler les valeurs de DS obtenues. Deux CMD de DS 0.2 et 0.4 sont obtenus (équivalent aux CMD 25% et 50% du chapitre 3), ce qui équivaut en moyenne à 61 et 122 unités substituées, respectivement, sur les 308 unités que possède une chaîne de dextrane (M_n = 50 $kg.mol^{-1}$ déterminé par SEC). Par la suite, le greffage du dextrane a été optimisé pour obtenir la meilleure efficacité de réaction versus le faible degré de substitution, ce qui est présenté dans le chapitre suivant. De plus, un CMD de DS 1.3 a aussi été synthétisé pour permettre de mieux comprendre l'influence du DS sur l'efficacité du greffage et sur le comportement biologique des surfaces greffées. Suite au greffage, les résultats ont montré que **le DS avait une influence sur la structure du revêtement**, un DS élevé permettant plus de points d'ancrage et abaissant la flexibilité des chaînes greffées, **et sur le comportement biologique** des surfaces greffées avec le CMD, le CMD 0.2 présentant les meilleures propriétés anti-thrombogéniques et permettant l'adhérence des cellules endothéliales tout en limitant celle des cellules musculaires lisses.

Ensuite, le CMD 0.2 aussi bien que le CMD 0.4 ont été utilisés pour la synthèse de copolymères CMD-PBMA afin d'évaluer l'influence que pourrait avoir le DS sur la copolymérisation et de ce fait sur les propriétés des copolymères obtenus.

6.1.2. Optimisation du greffage du CMD en milieu aqueux

La chimie des carbodiimides permet d'obtenir des liens amides en faisant facilement réagir les COOH avec les NH_2, cependant plusieurs réactions secondaires interviennent, d'où la nécessité d'optimiser la réaction pour une meilleure efficacité. Plusieurs carbodiimides, de formule générale R-N=C=N-R, sont couramment utilisés comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le diisopropylcarbodiimide (DIC) ou encore le **1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide** (EDC). Pour ce travail, l'EDC a été utilisé, car contrairement aux autres, il permet d'effectuer la réaction de greffage en milieux aqueux. De plus, la réaction a été faite en présence de **N-hydroxysuccinimide** (NHS), permettant **d'améliorer le rendement et de diminuer les réactions secondaires**. La réaction, présentée dans l'annexe 8.1 se déroule comme suit :

- EDC réagit avec les COOH du CMD pour former un ester intermédiaire instable (O-acylisourea).
- L'ester instable réagit avec NHS pour former un ester-NHS beaucoup plus stable, réduisant ainsi les réactions secondaires.
- L'ester-NHS réagit avec NH_2 pour former un lien amide par libération du NHS.

Parmi les réactions secondaires se trouvent le réarrangement possible de l'ester instable en isocyanate et un amide ou encore de multiples réactions entre NHS et EDC (annexe 8.1). Dans ce cas, une grande partie des réactifs est consommée par les réactions secondaires, d'où la nécessité d'optimiser le greffage selon la concentration de CMD et la concentration de EDC/NHS.

La réaction de greffage est équimolaire, 1 COOH pour 1 EDC/1 NHS, il faut donc que l'EDC/NHS soit en grand excès pour favoriser la réaction avec COOH mais aussi pour être en quantité suffisante pour toutes les réactions survenant. Après calcul et d'après la littérature, un ratio de 1 COOH pour 20 EDC/NHS a été utilisé. La concentration de CMD est aussi importante et la solution doit être assez diluée pour éviter les réactions dans le volume et permettre une meilleure réaction avec les surfaces aminées**.** Finalement, d'après la littérature et des greffages préliminaires analysés par XPS, **une concentration de 2 mg/mL en CMD a été utilisée, indépendamment du degré de substitution, et la quantité d'EDC et de NHS a été adaptée selon le ratio 1:20**.

D'autre part, la fonctionnalisation par plasma des surfaces a été optimisée sur des substrats de PTFE afin d'obtenir le maximum d'amines dans le but de favoriser la formation de liens covalents aux regards de la faible quantité de COOH des CMD. Pour cela l'influence des paramètres du plasma en lui-même ont été évalués (pression, puissance et flux des gaz) sur la quantité et la répartition des amines, mais aussi le temps de traitement, la distance source-substrat et la taille du substrat.

6.2. La conception de techniques de purification des polymères CMD et CMD-PBMA

Lorsqu'il s'agit d'applications médicales, il est important que les polymères utilisés ne contiennent pas de produits toxiques pour l'organisme ou des produits impliquant une réponse biologique indésirable. Par exemple, il a été observé que le relargage de plastifiants ou d'additifs utilisés lors de la synthèse du PVC et du Latex peut induire une réaction inflammatoire aiguë.[18] Il donc essentiel de s'assurer de la pureté des polymères avant leur application à un milieu biologique (culture cellulaire, tests in vivo ou cliniques), particulièrement lorsque la synthèse s'effectue en milieu organique où les solvants utilisés peuvent être toxiques, afin d'éviter :

- Le relargage de composés toxiques tels que des solvants, des produits secondaires ou des additifs.
- La présence de produits secondaires qui peuvent avoir un effet biologique, chimique ou physique différent de celui visé.

Dans ce chapitre sont présentées les techniques développées au cours de ce projet qui ont permis d'éliminer tout produit secondaire et ainsi d'obtenir des polymères, CMD et CMD-PBMA, purs.

6.2.1. La précipitation dans un non-solvant

Après synthèse, l'utilisation de solvants organiques permet la récupération des macromolécules. Après synthèse du CMD ainsi que du copolymère CMD-PBMA, les chaînes résultantes sont récupérées par **précipitation et filtration**. Cette technique, consiste à ajouter goutte à goutte une solution (CMD) ou une suspension (CMD-PBMA) dans un non-solvant du polymère synthétisé, sous forte agitation, le forçant à adopter une configuration permettant de le filtrer**. Cette étape est cruciale, car elle permet à la fois la purification du polymère et sa mise en forme (formation d'une poudre).** Une bonne précipitation dépend alors de trois paramètres importants : la concentration et le volume de la solution/suspension de polymère et le volume de non-solvant dans lequel il est précipité. Une solution/suspension de polymère trop concentrée forme un gel ou de trop grosses particules, une solution trop diluée, de trop petites particules pour être filtrées. Un volume trop faible de non-solvant va former des amalgames. Pour ce travail, le CMD et le copolymère de CMD-PBMA ont été précipités avec un ratio de 1 mL de solution/suspension de polymère pour 10 mL de non-solvant et les concentrations de solutions/suspensions étaient de 120 $mg.mL^{-1}$, pour le CMD, et d'environ 77-95 $mg.mL^{-1}$ pour le CMD-PBMA.

Par la suite, d'autres techniques et méthodologies ont été mises au point autour de ces étapes de précipitations, propres aux polymères ou copolymères considérés, comme le décrivent les sections suivantes.

6.2.2. La purification du CMD

Le **chapitre 4.4.1** présente en détail la méthode de synthèse du CMD. La carboxyméthylation du dextrane s'effectue en présence d'acide monochloroacétique (MCA), qui va substituer un groupement CH_2-COOH à un hydrogène du dextrane. Des CMD avec 3 degrés de substitution différents (nombre de CH_2-COOH différent sur la chaîne) ont été synthétisés et purifiés de la même façon. En parallèle de la carboxyméthylation, une réaction secondaire se produit entre le MCA et le NaOH, formant de l'acide glycolique. Avant précipitation dans le méthanol, la solution de CMD, fortement basique, est neutralisée par ajout d'acide acétique concentré. Les polymères sont ensuite filtrés sur fritté et rincés a l'éther diéthylique avant d'être mis à sécher sous vide. La méthodologie générale de purification est présentée dans la Figure 38.

Après un premier processus de précipitation et séchage, le CMD a été analysé par RMN-^{1}H et la présence d'acides chloroacétique, acétique et glycolique a été observée. Ces acides sont solubles dans le méthanol et sont éliminés en grande partie lors de l'étape de précipitation. Les acides restants ne représentent peut-être pas une dose toxique biologiquement parlant, toutefois ils peuvent diminuer l'efficacité du greffage du CMD, par la suite, en se liant aux surfaces aminées à la place des CMD. Afin d'éliminer ces acides, plusieurs méthodes de purification ont été étudiées selon deux approches principales : 1) adapter la concentration de la solution de CMD à précipiter 2) effectuer de nouvelles dissolutions/précipitations. La première approche vise à diminuer la concentration de la solution de CMD à précipiter afin de mieux libérer les acides lors de la précipitation, cependant les particules obtenues étaient trop fines pour être filtrées. Pour la seconde approche, l'objectif était d'effectuer plusieurs dissolutions et précipitations afin d'éliminer à chaque fois un peu plus d'acides. Le CMD a été analysé RMN-^{1}H après chaque étape. **Finalement, il a été déterminé que deux étapes de dissolutions et précipitations (Figure 38) étaient nécessaires pour éliminer les acides et purifier le CMD (annexe 8.2)**.

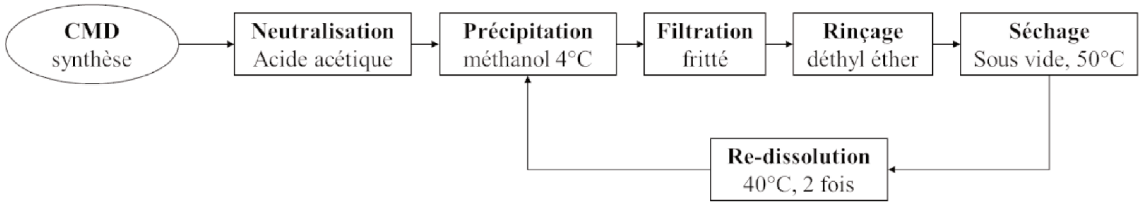


Figure 38 : Méthodologie de purification du CMD.

Toutefois, ces multiples précipitations impliquent plus de contact entre le CMD et des solvants toxiques. La présence de méthanol et d'éther diéthylique a été observée en RMN-^{1}H dans le polymère (annexe 8.2). Le diéthyl éther et le méthanol sont miscibles et possèdent des températures d'ébullition respectives de 34,6°C et 64,7°C. Donc, le rinçage à l'éther diéthylique, plus volatil, permet déjà de mieux éliminer le méthanol du CMD lors de la filtration et de mieux l'assécher. Cependant, le simple séchage sous vide à 50°C, même de plus longue durée, n'a pas été suffisant à éliminer les solvants restants. Les molécules de solvants peuvent être piégées par les chaînes de CMD ou interagir avec elles (forces de Van der Waals, liaison hydrogène) ou encore la surface

d'échange est insuffisante lors du séchage. **Afin de mieux éliminer les solvants, le CMD est re-dissout à 40°C.** Les chaînes plus flexibles libèrent plus facilement les molécules de solvants qui sont en partie évaporées (Figure 38).

La méthodologie mise en place dans ce travail a permis d'obtenir un polymère de CMD parfaitement pur, et consiste en 3 étapes de dissolution/précipitation/filtration/rinçage et de séchage sous vide à 50°C minimum 1h, entre chaque étape.

6.2.3. L'importance de la mise en forme du CMD-PBMA pour sa purification

Le **chapitre 5** présente la méthode de synthèse et de purification des copolymères CMD-PBMA. Brièvement, la purification du CMD-PBMA se déroule en 3 grandes étapes : précipitation, purification en milieu aqueux et purification en milieu organique par extraction. Chacune de ces étapes influe sur la taille de particules du copolymère. **Le copolymère de CMD-PBMA n'étant soluble dans aucun des solvants utilisés pour la purification, l'objectif était d'obtenir les particules de CMD-PBMA les plus fines possible** afin de :

- faciliter la purification (solvants et molécules liées).
- faciliter et permettre la mise en œuvre des techniques de caractérisation (ex. RMN du solide).
- homogénéiser au mieux l'échantillon de copolymère.

Les enjeux des étapes de purification du copolymère de CMD-PBMA sont détaillés dans l'annexe 8.3. Brièvement, ces étapes et les enjeux principaux sont les suivants :

- **Précipitation dans l'éthanol** : comme pour le CMD, cette étape permet à la fois de récupérer les macromolécules et d'effectuer une première élimination des contaminants, comme le BMA n'ayant pas réagi et une partie des ions.

- **Élimination du CMD et Ce** : les macromolécules sont lavées avec de l'EDTA puis de l'eau. L'EDTA permet de mieux éliminer les ions Ce^{3+}. Cette étape permet d'éliminer tous les produits solubles dans l'eau comme le cérium, le CMD n'ayant pas réagi, les ions de la réaction, etc. A cette étape, si les particules de copolymères sont trop grosses elles peuvent emprisonner le cérium, entre autres, qui est toxique pour l'organisme. Plus fines sont les particules, meilleures sera l'élimination des contaminants.

- Le produit résultant, contenant du CMD-PBMA et de l'homopolymère de PBMA, est lyophilisé afin de former une poudre. Le PBMA étant un thermoplastique, un séchage sous vide à chaud durcit les chaînes de polymères qui s'agglomèrent et perdent leur aspect de poudre, d'où le choix de la lyophilisation.

- **Extraction au soxhlet** : est une l'étape la plus délicate quant à la mise en forme du copolymère. L'extraction dans de l'acétone permet l'élimination de l'homopolymère de PBMA. L'extraction est

grandement améliorée si le produit à extraire est une poudre très fine. Avec les reflux d'acétone, le copolymère se transforme en « gel » colloïde très visqueux dû à la grande quantité de PBMA qu'il contient.

- La récupération du copolymère après extraction est délicate. L'acétone est éliminée par lavage à l'eau, mais au contact de l'eau les chaînes de copolymères s'agglutinent et durcissent formant une sorte de gomme dure. Afin de former une poudre fine, une méthode de précipitation « inversée » a été mise en place. Elle consiste à alterner l'ajout d'eau dans une suspension de copolymère dans de l'acétone et l'agitation au vortex. Ainsi, le copolymère forme de fines particules dans le mélange eau/acétone et l'acétone et finalement éliminée par rinçage à l'eau. Enfin, le copolymère final purifié est lyophilisé et forme une poudre fine blanche.

Toutes les étapes de purification mises en place et en partie **conçues dans le cadre de ce projet**, ont permis d'obtenir **un copolymère pur**, ne présentant aucune trace de cérium ou de solvants ni de produits secondaires après analyses en RMN, ATR-FTIR, XPS et SEC. De plus, le produit final se présente sous forme **d'une poudre blanche très fine** qui facilitera la caractérisation et l'homogénéité de l'échantillon.

6.3. La méthodologie développée et les défis relevés pour la caractérisation des copolymères

En synthèse de polymères, la caractérisation du produit final (composition chimique, masse moléculaire, rendement, etc.) est cruciale afin de comprendre, non seulement, le mécanisme de réaction impliqué mais aussi la relation structure-propriétés présentée par le polymère. Dans ce but, une partie du travail effectué s'est consacré à la l'étude de la composition et de la structure des copolymères CMD-PBMA, et les résultats obtenus sont présentés dans le **chapitre 5**. Pour rappel, 4 copolymères ont été synthétisés en faisant varier la quantité initiale de CMD par rapport au BMA (w_{CMD}/w_{BMA}) ainsi que le degré de substitution (DS) du CMD initial : 1) w_{CMD}/w_{BMA} = 0,07 et DS = 0,2 ; 2) w_{CMD}/w_{BMA} = 0,07 et DS = 0,4 ; 3) w_{CMD}/w_{BMA} = 0,30 et DS = 0,2 ; 4) w_{CMD}/w_{BMA} = 0,30 et DS = 0,4. Ces 4 conditions de synthèses forment respectivement CMD-PBMA 1, CMD-PBMA 2, CMD-PBMA 3 et CMD-PBMA 4.

Les grandes masses moléculaires mises en jeu par les polymères de CMD et de PBMA associées aux propriétés de solubilité du copolymère de CMD-PBMA ont fait de sa caractérisation un défi particulièrement intéressant. Ce chapitre développe le cheminement adopté ayant permis la détermination partielle de la structure et de la composition du CMD-PBMA, par le biais de plusieurs **techniques d'analyses** et d'une bonne **compréhension du mécanisme** de copolymérisation.

6.3.1. Les techniques de caractérisation

Suite à la synthèse des copolymères CMD-PBMA, leur solubilité a été évaluée dans différents solvants (Chapitre 5.4.5.1). Les copolymères forment une dispersion colloïdale dans un mélange de THF/eau (90:10). L'absence de solvant unique et de solubilité complète ont mené à l'utilisation majeure de techniques d'analyses à l'état solide. La précision des résultats obtenus avec ces techniques a été grandement améliorée par le fait que le copolymère soit une poudre très fine et homogène, comme mentionné précédemment, en particulier pour la RMN du solide qui nécessite d'introduire l'échantillon dans un tube de quelques millimètres de diamètre. La méthodologie et les résultats relatifs à chaque technique sont les suivants :

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) : effectuée sur de la poudre ainsi que des films de copolymères, a permis de facilement montrer le succès de la copolymérisation par la présence des bandes relatives au CMD et au PBMA au sein du copolymère. Le rapport d'intensité des bandes relatives à chaque homopolymère a montré que les copolymères étaient majoritairement composés de PBMA (≈ 95 %), confirmant les premières observations faites lors de l'étude de la solubilité (90% en THF, solvant du PBMA).

La résonnance magnétique nucléaire (RMN) : Dans un premier temps, la RMN du liquide a été envisagée, plus facile d'exécution et plus précise que la RMN du solide, en dispersant le copolymère dans un mélange de THF et d'eau deutérés. Cependant, la dispersion des copolymères ne permettait pas de révéler la présence de CMD. En revanche, la RMN-^{13}C du solide a clairement montré le succès de la copolymérisation par la présence des pics relatifs au CMD et au PBMA au sein des copolymères. Le profil des spectres et l'intensité des pics obtenus ont confirmé la grande quantité de PBMA contenue dans les copolymères, comme observé précédemment.

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) : Pour obtenir la masse moléculaire des copolymères, des analyses en CES ont été considérée, mais pour cela les copolymères devraient être solubles dans un solvant unique. Afin de palier à cette difficulté, il a été proposé d'évaluer les masses moléculaires des deux homopolymères CMD et PBMA séparément. Le dextrane ainsi que les CMD ont donc été analysés avant la copolymérisation et les Mn obtenues sont de 50, 51 et 58 kg.mol^{-1} pour le dextrane, le CMD 0.2 et le CMD 0.4 respectivement. Cependant, le PBMA étant directement polymérisé sur la chaîne de CMD, il a fallu trouver une façon de séparer les chaînes de PBMA des chaînes de CMD. Pour cela les chaînes de CMD contenues dans les copolymères ont été détruites et les chaînes de PBMA récupérées par la technique de dégreffage, tel que décrit ci-après. Les Mn obtenues sont comprises entre 600-900 kg.mol^{-1} pour les 4 CMD-PBMA synthétisés.

Le dégreffage : les chaînes de PBMA ont été séparées du CMD par hydrolyse acide, qui coupe les liaisons glycosidiques du CMD. Outre la détermination de la masse moléculaire des chaînes de PBMA par SEC, cette technique a permis d'obtenir la masse des chaînes de PBMA dégreffées qui est comparée à la masse du copolymère initial. Ainsi il a été déterminé que les 4 CMD-PBMA sont composés de 80-95 % en masse de

PBMA. De plus, les mesures de compositions massiques et de masses moléculaires ont permis de déterminer que les chaînes de copolymères sont composées d'une chaîne de CMD et d'une ou deux chaînes de PBMA, suggérant une structure plutôt de type bloc.

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) : permet de déterminer la température de transition vitreuse (Tg) d'un polymère. Dans le cas d'un copolymère, elle peut permettre d'obtenir de l'information sur la structure : si la structure est en peigne, une seule Tg devrait être observée, si la structure est en bloc, 2 Tg proches des Tg des homopolymères devraient être observées. Des analyses préliminaires n'ont pas permis d'observer de Tg pour les CMD seuls, ni pour les copolymères de CMD-PBMA. En revanche, le polymère de chaînes degreffées de PBMA présente une Tg vers 40°C, ce qui est en accord avec la littérature.

L'analyse thermogravimétrique (TGA) : mesure la perte de masse d'un composé en fonction du temps et selon un profil de température. Les températures de dégradation du CMD et du PBMA dégreffé ont été déterminées à 250°C et 160°C, respectivement. Comme les températures de dégradation étaient suffisamment éloignées, on pouvait s'attendre à observer 2 pertes de masses distinctes pour les copolymères de CMD-PBMA, correspondant respectivement au CMD et au PBMA. L'analyse de poudres et de films de copolymères n'ont pas permis ces observations. En revanche, il a été déterminé que les copolymères CMD-PBMA possédaient une température de dégradation de 200°C, qui est comprise entre les températures de dégradation des deux homopolymères CMD et PBMA.

La spectrométrie de masse à ionisation secondaire par temps de vol (ToF-SIMS) : consiste à bombarder une surface avec un faisceau d'ions qui pulvérise une partie de l'échantillon sous forme d'ions. Ces ions sont alors accélérés vers un spectromètre de masse. L'analyse des fractions obtenues pourrait donner de l'information quant à la structure du copolymère. Cependant, l'analyse préliminaire des copolymères présentait des spectres avec de nombreux pics difficiles à déterminer, qui en plus ne possédaient pas de fragments spécifiques à chaque molécule.

Les informations obtenues avec la caractérisation des copolymères ont été couplées à différents mécanismes de réaction présents dans la littérature, permettant de suggérer un mécanisme de copolymérisation des CMD-PBMA.

6.3.2. Méthodologie de la détermination du schéma réactionnel

La copolymérisation radicalaire libre est une façon simple de polymériser des monomères vinyliques sur une chaîne de polysaccharide. Malgré des recherches actives au cours des dernières décennies, le mécanisme exact de réaction est encore incertain et plusieurs réactions ont lieu simultanément comme l'initiation, la propagation, etc. Le travail effectué couplé à une revue de la littérature sur les mécanismes de copolymérisation, ont permis d'émettre des hypothèses quant aux réactions mises en jeu lors de la copolymérisation et de suggérer un mécanisme de réaction partiel pour la synthèse du CMD-PBMA qui est présenté **chapitre 5**.

Outre les synthèses des 4 CMD-PBMA, rappelées en introduction du chapitre 6.3, d'autres synthèses contrôles ont été effectuées afin d'approfondir la connaissance du mécanisme et sont présentées dans ce chapitre.

Formation des radicaux

Afin d'avoir une idée de la structure des copolymères formés, il est intéressant de savoir où et comment se forment les radicaux qui vont amorcer la polymérisation des monomères BMA. Les radicaux sont formés grâce à un système redox à partir des ions Ce(IV) qui sont de puissants oxydants en milieu acide. Le réducteur du système serait alors le polysaccharide, dans ce cas le CMD. Les radicaux formés sont très réactifs et la réaction se fait alors sous atmosphère inerte pour éviter que le dioxygène ne capte les radicaux. Plusieurs articles relatent que le cérium forme un complexe avec les groupements hydroxyles du polysaccharide dont le clivage ou la dismutation forme un radical libre et un H^+.[129,172,178,194,195] En 1976, Norman G. Gaylord proposait un mécanisme quelque peu différent, impliquant une interaction donneur-accepteur entre un complexe polysaccharide-eau-monomère-cérium et un monomère non-complexé.[187]

Dans ce travail, il d'abord été montré qu'aucun radical ne se forme en l'absence de CMD : la synthèse a été effectuée dans les mêmes conditions uniquement en présence de BMA et Ce(IV) et aucun polymère de PBMA n'est formé. Cela indique que, lors de la synthèse de CMD-PBMA, les radicaux se forment sur le CMD. Comme expliqué dans le **chapitre 5.5.2**, les chaînes de CMD se terminent par une unité présentant un hémiacétal possédant un pouvoir réducteur bien plus important que les hydroxyles ou les glycols de la chaîne de polysaccharide. Afin d'étudier cette réactivité sur la formation des radicaux, l'hémiacétal a été réduit en alcool pour les CMD 0.2 et CMD 0.4. La synthèse a alors été faite dans les mêmes conditions que pour CMD-PBMA 3 et CMD-PBMA 4, synthétisés à partir du ratio le plus élevé en CMD afin de mieux voir son influence. Les chaînes de PBMA ont été dégreffées et analysées par SEC. Les résultats sont présentés dans le Tableau 22. Les résultats sont comparés aux synthèses sans réduction de l'hémiacétal, correspondantes :

- **Vitesse d'opacification** : lorsque le CMD-PBMA se forme, il devient insoluble dans l'eau et augmente la densité optique du milieu réactionnel. Aucune différence n'a été observée entre les conditions avec et sans réduction de l'hémiacétal. Donc la vitesse de réaction est similaire même sans l'hémiacétal.
- **Rendement de synthèse** : les rendements en masses sont similaires, mais il se peut que la structure et la composition du copolymère soient différentes.
- **Homopolymère** : La quantité d'homopolymère formée est plus faible lorsque l'hémiacétal est réduit. Cela peut suggérer que les radicaux formés sont moins réactifs à la polymérisation du BMA.
- **Dégreffage** : La pesée des chaînes degreffées PBMA suggère une composition en PBMA similaire que lorsque l'hémiacétal n'est pas réduit soit 80-90 % en masse de PBMA dans le copolymère. Les masses moléculaires des chaînes de PBMA sont similaires, suggérant que la polymérisation des BMA s'effectue de même manière.

Tableau 22: Comparaison des résultats entre les synthèses faites à partir de CMD et celles faites à partir de CMDOH où l'hémiacétal terminal a été réduit.

		Synthèse			HPSEC[d]	
					CMD	gPBMA
Copolymers	**DS_{CMD}[a]**	**w_{CMD}/w_{BMA} (g/g)[b]**	**Rendement (%)**	**hPBMA (%)[c]**	**M_n ($kg.mol^{-1}$)**	**M_n ($kg.mol^{-1}$)**
CMDOH-PBMA 3*	0.2	0.30	40	40	51	800
CMDOH-PBMA 4*	0.4	0.30	26	44	58	1 000
CMD-PBMA 3	0.2	0.30	35 ± 3	68 ± 4	51	600 - 900
CMD-PBMA 4	0.4	0.30	30 ± 2	60 ± 10	58	600 - 700

* Synthèse dans les mêmes conditions que CMD-*PBMA 3 et 4 mais avec CMD dont l'hémiacétal a été réduit* en alcool
[a] Degré de substitution du CMD
[b] Ratio massique initial du CMD (w_{CMD}) et des monomères de BMA (w_{BMA})
[c] Teneur en homopolymère
[d] Masse moleculaire en nombre déterminée par SEC du CMD initial et des chaines dégreffées de PBMA (gPBMA)

En résumé, la polymérisation du PBMA sur la chaîne de CMD a tout de même lieu lorsque l'hémiacétal est réduit, suggérant que les radicaux peuvent se former ailleurs sur la chaîne de CMD (hydroxyles et glycol). La composition en CMD/PBMA du copolymère obtenu semble similaire à copolymère dont l'hémiacétal est actif, mais sa structure peut être différente. Il est à noter que le taux d'oxydation de l'hémiacétal est 360 fois plus rapide que pour les glycols et les hydroxyles[195], mais que ceux-ci sont bien plus nombreux : une chaîne de CMD ne possède qu'un seul hémiacétal. Il est alors suggéré que de la formation des radicaux réside dans une compétition nombre-réactivité entre l'hémiacétal et les hydroxyles et glycols.

Formation des chaînes de PBMA

Dans ce travail, il a été suggéré en se basant sur les résultats et la littérature que les chaînes de PBMA greffées au CMD provenaient majoritairement de la terminaison de chaînes de PBMA en croissance. Cette théorie est soutenue par l'analyse SEC de l'homopolymère de PBMA qui présente une longueur de chaînes (M_n) équivalente à celle des chaînes de PBMA greffées. Le mécanisme de formation des chaînes de PBMA est encore incertain, toutefois il est suggéré qu'une petite partie des monomères de BMA dissoute réagit avec les radicaux du CMD pour amorcer la polymérisation et sa terminaison s'effectue sur la chaîne de CMD (CMD-PBMA) ou par interaction avec une autre chaîne en croissance (homopolymère PBMA). Selon les résultats précédents, la plus faible quantité d'homopolymères formés lorsque l'hémiacétal est réduit peut signifier que les radicaux formés sont moins réactifs à la polymérisation des BMA, donc moins de terminaisons s'effectuent avec des chaînes en croissance donc moins d'homopolymères formés.

En conclusion, il est suggéré que le CMD forme un complexe avec le cérium et possiblement un monomère de BMA, au sein duquel une réaction rédox va former un radical. D'un point de vue réactivité, ce complexe se forme préférentiellement au niveau de l'unité terminale (hémiacétal), et d'un point de vue nombre de sites disponibles, au niveau des hydroxyles et les glycols. Ces radicaux sont transférés à la portion de monomères de

BMA dissoute dans le milieu puis se propage pour former des chaînes de PBMA en croissance. La terminaison de ces chaînes sur le CMD forme le copolymère CMD-PBMA. Indépendamment du degré de substitution des CMD, les copolymères présentent les caractéristiques suivantes :

- **Composition massique** : 85-90 % de PBMA et 10-15 % de CMD
- **Masse moléculaire moyenne en nombre des homopolymères CMD** : 51-58 $kg.mol^{-1}$
- **Masse moléculaire moyenne en nombre des homopolymères PBMA** : 600-900 $kg.mol^{-1}$
- **Fréquence de greffage** : 1 à 2 chaînes de PBMA par chaîne de CMD.
- **Masse moléculaire moyenne en nombre des copolymères CMD-PBMA** : par extrapolation, 700-2 000 $kg.mol^{-1}$
- **Structure** : majoritairement bloc d'après la fréquence de greffage et la formation des radicaux
- **Solubilité** : dispersion colloïde dans un mélange 90:10 THF/eau (vérifié jusqu'à 50 $mg.mL^{-1}$)
- **Température de dégradation** : 200 °C

6.4. Limites et perspectives : de la synthèse à l'application

6.4.1. Mieux comprendre la structure et la composition du copolymère CMD-PBMA

Le travail effectué en parallèle sur la caractérisation des copolymères de CMD-PBMA et sur les hypothèses émises quant au mécanisme de copolymérisation ont permis d'obtenir plusieurs informations concernant le produit final qu'il serait intéressant d'approfondir. En effet, une connaissance précise du mécanisme de réaction et le développement des techniques d'analyses amènerait à une bonne maitrise de la structure et la composition du copolymère final, permettant ainsi de comprendre et de moduler la réponse biologique ou mécanique ou encore le greffage sur des surfaces. Classiquement, la caractérisation du produit final permet de comprendre le mécanisme de réaction. Dans le cas, des copolymères CMD-PBMA la caractérisation peut être complexe parfois. Il est alors possible d'envisager de comprendre le mécanisme de réaction en premier lieu, ce qui permettrait de mieux prédire la structure et la composition du copolymère final. Pour ce faire plusieurs approches sont envisageables :

- Démontrer la localisation des radicaux par l'étude de l'oxydation par Ce(IV) d'oligosaccharides ou unité de CMD par résonnance de spin électronique.[170,195]
- Développer les techniques de caractérisation des copolymères, par exemple comme le MALDI-ToF (désorption-ionisation laser assistée par matrice par temps de vol, de l'anglais Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight), le ToF-SIMS, la DSC, etc.
- Approfondir la connaissance du mécanisme en étudiant des réactions similaires comme la copolymérisation du dextrane-PMMA qui permet d'obtenir des copolymères solubles.[141]

- Caractériser les produits secondaires obtenus et éliminés à chaque lavage.
- Réduire la longueur des chaînes de PBMA pour obtenir des polymères plus faciles de caractérisation.

Ce dernier point permettrait de rester plus proche des conditions de synthèse du CMD-PBMA. En gardant la même concentration de monomères BMA, la propagation des chaînes de PBMA peut être efficacement stoppée par l'ajout d'hydroquinone, puissant réducteur. Les copolymères résultants présenteraient des chaînes de PBMA plus courtes mais localisées aux mêmes endroits que pour une copolymérisation normale, et pourraient posséder une meilleure solubilité, ce qui permettrait des analyses en RMN-^{1}H, par exemple. Pour toutes les perspectives envisagées, automatiser la synthèse permettrait de diminuer l'influence des facteurs environnementaux, tel que l'injection des monomères.

6.4.2. Le greffage du copolymère : les approches

Le greffage du copolymère représente tout un travail d'optimisation et de recherches exploratoires, d'intérêt majeur en termes de nouvelles méthode de greffage. En effet, très peu de réactions de couplage via un carbodiimide dans un mélange de solvants sont présentées dans la littérature (Tableau 23), ce qui est la stratégie envisagée pour les copolymères CMD-PBMA solubles dans un mélange de THF/eau 90:10. Les résultats obtenus avec le greffage du CMD seul peuvent être utilisés pour mettre en place la réaction de greffage, en outre puisque EDC est soluble aussi bien dans l'eau que dans le THF. La réaction de greffage est possible uniquement en présence d'EDC, toutefois, il serait intéressant d'évaluer la solubilité de NHS dans le THF ainsi que la possibilité de l'activation des carboxyles dans ce milieu, afin d'améliorer l'efficacité du greffage. D'autres approches peuvent être envisagées comme l'utilisation de différents carbodiimides, ou d'un autre type de chimie.

Tableau 23 : Exemple de greffage dans un mélange de solvants.

Réactif aminé	Réactif carboxylé	Carbodiimide	Solvant	Réf.
O-benzylhydroxylamide hydrochloride	Acide nitromethanetrispopionic	EDC	THF/eau (1:1) pH = 4,8	196
N-isopropylhydroxylamine	Tris-acide 1			
Dansyl cadaverine	Protéine (apo-ferritin)	EDC	THF/eau (1:1) pH = 5,5-6	197

6.4.3. La conception de revêtements pour moduler les propriétés biologiques

Les films de copolymères obtenus dans ce travail ont démontré des propriétés d'anti-adhérence envers les cellules endothéliales et fibroblastes 3T3, indépendamment du degré de substitution du CMD et du ratio de CMD/BMA initial (chapitre 5). Ces propriétés anti-adhérentes ont aussi été démontrées versus les cellules

musculaires lisses (annexe 8.4) et d'autres tests préliminaires ont présentés des résultats prometteurs en termes d'anti-adhérence vis-à-vis de bactéries ou de cellules cancéreuses HeLa (annexe 8.5).

Un même polymère pour différentes réponses biologiques

En résumé, les copolymères CMD-PBMA, ainsi que le PBMA, présentent des propriétés d'anti-adhérence versus les cellules endothéliales, musculaires lisses et les fibroblastes 3T3. Quelques articles de la littérature relatent de la réponse biologique de surfaces de PBMA et de copolymères de dextrane-PBMA, versus les cellules endothéliales (EC) et musculaires lisses (CML) (Tableau 24). Étonnamment, des revêtements de PBMA seuls permettent, dans un cas, la prolifération des EC[120] et dans un autre l'empêche.[142] De plus, un article suggère que le PBMA conduit à l'apoptose des CML[121] alors qu'un autre article suggère qu'il permet leur prolifération.[142] Pour les copolymères de dextrane-PBMA (DB),[142] 3 types de copolymères sont synthétisés avec des quantités initiales de dextrane différentes : 0,125 g, 0,5 g et 0,75 g. Uniquement, le copolymère synthétisé à partir de 0,125 g de dextrane (DB1) permet de favoriser les cellules endothéliales et d'inhiber les cellules musculaires lisses. Pour les autres compositions, très peu de cellules sont observées. Donc, pour un très faible changement de composition la réponse cellulaire du copolymère est différente.

La disparité des résultats obtenus ne peut être clairement expliquée, principalement parce que les connaissances des mécanismes d'adhérence cellulaire nécessitent encore d'être approfondies. Cependant, quelques pistes de réflexion peuvent être abordées. Par exemple, pour les 3 articles présentés, le mode de fabrication des revêtements de PBMA est différent impliquant des différences dans les facteurs influençant l'adhérence comme l'hydrophobicité, les interactions électroniques ou ioniques, la topographie, etc. Une grande différence dans l'angle de contact est alors observée ce qui peut influer sur l'adhérence des cellules. Dans le 2e article,[121] il est suggéré que l'apoptose des CML serait due à l'acide méthacrylique présent dans le revêtement de PBMA, non présent pour les autres articles d'après leur conception. Les surfaces fabriquées dans le 3e article[142] utilisent les mêmes méthodes que dans ce travail. Les différences obtenues pour copolymère peuvent venir de la différence entre le dextrane et le CMD contenu dans le copolymère. Les différences observées pour les revêtements de PBMA sont plus délicats à expliquer, car la seule différence pertinente serait la longueur de chaînes du PBMA qui, dans un cas, est polymérisé en masse par AIBN[142] et dans l'autre, est commercial (dans ce travail). Toutefois, sous forme de film, cette différence ne devrait pas influer autant. Il se peut alors qu'une petite différence de fabrication change beaucoup la réponse cellulaire, comme c'était aussi le cas pour les différents copolymères Dextrane-PBMA. **La réponse biologique peut alors être modulée dès la fabrication du revêtement**.

Tableau 24 : Réponse biologique de revêtements de PBMA et de copolymères Dextrane-PBMA dans la littérature et dans ce travail.

Surface	Stérilisation	Méthode	Résultats	Réf.
Matériaux : **PBMA** polymérisé par plasma **Surface** : Dépôt par plasma de BMA avec flux de O_2 sur 316L traité à l'oxygène	Rinçage EtOH 70% puis UV 30 min	**HUVEC**, contact direct Prolifération : 1, 2, 3 et 4 jours Comptage par hémocytomètre Observation au MEB	**XPS** : même composition que PBMA **CA** : 2-3° **Cellules** : Prolifération des HUVECs (de 14 000 cell. à j0 à 50 000 cell. à j5) Formation de points focaux, tapis cellulaire	120
Matériaux : **PBMA** polymérisé à la surface **Surface** : Revêtement par polymérisation d'une solution de BMA dans n-butoxyethanol déposée sur stent 316L puis durcie avec anyline	Gaz d'oxyde d'éthylène	**CML**, contact direct Prolifération : 1 et 2 jours Apoptose : 1 jour	**Cellules** : Prolifération des CML réduite et apoptose des cellules (jusqu'à 80%)	121
Matériaux : **Dx-PBMA** synthétisé par copolymérisation radicalaire libre. **PBMA** synthétisé avec AIBN. **Surfaces** : Film par évaporation de THF/eau (90/10).	UV 15 min	**HUVEC** et **CML**, contact direct Prolifération : 1 et 4 jours Observation au microscope à contraste de phase	**CA** : PBMA 88° et DB1 80° **Cellules** : **PBMA** : Prolifération des CML (de 5 000 à 110 000 cell./cm² de j1 à j5) Inhibition de la prolifération des EC (2 500 cell./cm² de j1 à j5) **Dx-PBMA** : DB1 Faible prolifération des CML (de 5 000 à 25 000 cell./cm² de j1 à j5) Prolifération (de 2500 à 65 000 cell./cm² de j1 à j5) et migration des EC	142
Matériaux : **CMD-PBMA** synthétisé par copolymérisation radicalaire libre. **PBMA** commercial. **Surfaces** : Film par évaporation de THF/eau (90/10).	Rinçage EtOH 70%	**HUVEC** et **CML**, contact direct Prolifération : 1, 3 et 4 jours Comptage par compteur Coulter Observation au microscope à contraste de phase	**CA** : PBMA 88° et CMD-PBMA 80-84° **Cellules** : Aucune adhérence des CML et HUVEC pour **PBMA** et **CMD-PBMA.**	-

AIBN – azobisisobutyronitrile ; THF – tétrahydrofurane ; EtOH – éthanol ; UV – ultra-violet; CML – cellules musculaires lisses ; EC – cellules endothéliales ; CA – angle de contact ; XPS - spectrométrie photoélectronique à rayons X; cell. – cellules.

*Un large spectre d'application*s

Il serait alors intéressant d'approfondir la connaissance du comportement biologique des revêtements de copolymères CMD-PBMA sous forme de film ou de chaînes greffées à une surface. Les propriétés d'anti-adhérences des films de CMD-PBMA peuvent être développées versus les protéines, les bactéries ou encore le sang pour des applications telles que les cathéters. Il serait particulièrement intéressant de voir si ces propriétés sont conservées après greffage du copolymère, afin d'obtenir un revêtement plus stable, ou encore si la disparition de groupements hydroxyles libres (utilisés pour les liens amides) changerait la réponse cellulaires des revêtements de CMD-PBMA, ce qui permettrait l'utilisation du copolymère pour un large champ d'applications, parmi lesquelles peut être l'application aux stents.

7. Conclusions

Ce travail a traité de l'utilisation du dextrane comme revêtement pour des applications liées au vasculaire, mettant en jeu différentes approches comme la modification de surface ou la modification de polysaccharide. Dans un premier temps, des surfaces fluorocarbonées ont été greffées avec des dextrane carboxyméthylés (CMD). Puis dans un second temps ces dextrane carboxyméthylés ont été copolymérisés avec du poly(méthacrylate de butyle) (PBMA) et des films de copolymères ont été produits. Chaque étape de modification du dextrane a été analysée d'un point de vue chimique à partir de techniques comme la spectroscopie FITR, la RMN, la spectrométrie XPS ou encore la chromatographie d'exclusion stérique. La réponse biologique des surfaces obtenues a été étudiée ainsi que la réponse mécanique des films de copolymères CMD-PBMA. Les revêtements de CMD greffés à des films de PTFE aminé par plasma ont montré une meilleure anti-thrombogénicité et une meilleure adhérence des cellules endothéliales que le PTFE nu, tout en limitant l'adhérence des cellules musculaires lisses. Les copolymères CMD-PBMA ainsi que leurs synthèses ont été caractérisés, montrant des copolymères majoritairement formés de longues chaînes de PBMA et d'une petite proportion de CMD. Ces copolymères ont présenté une bonne résistance à la déformation ainsi que des propriétés d'anti-adhérence de cellules endothéliales et fibroblastes.

Le travail effectué a permis de montrer qu'en plus de leur composition, la structure avait une forte influence sur les propriétés des matériaux obtenus. Une bonne connaissance de la chimie des copolymères ainsi que de leur structure et composition, permettrait de moduler la réponse du matériau, que ce soit versus la malléabilité chimique ou versus l'adhésion cellulaire, dépendamment de l'application visée. Ainsi, les modifications du dextrane présentent un intérêt particulier et les résultats obtenus dans ce travail en montre une petite partie pour le domaine des biomatériaux. Les nombreux choix de matériaux possibles permettent de diriger l'utilisation du dextrane et de ces dérivés vers un large spectre d'applications.

8. Annexe

8.1. Le greffage du CMD par EDC/NHS

Le greffage du CMD sur les surfaces aminées s'effectue par réaction avec un carbodiimide (EDC) et permet de former un lien amide entre le polymère et la surface. La chimie des carbodiimides est connue pour former de nombreuses réactions secondaires dues à l'instabilité du composé intermédiaire (O-acylisourea). En effet, lorsque seul le carbodiimide est utilisé afin de créer des liens amides, l'ester intermédiaire peut réagir de 3 façons différentes :

- réaction avec une amine pour former un lien amide, avec libération d'une urée (R-NH-CO-NH-R)
- réaction avec un autre groupement carboxylique qui forme un anhydride carboxylic, qui peu par la suite former un lien amide voulu
- réarrangement du O-acylisourea instable en N-acylurea stable, réaction secondaire majoritaire.

L'utilisation d'additifs comme NHS, permet de limiter fortement ces réactions secondaires en formant un composé intermédiaire actif plus stable et ainsi d'améliorer le rendement de la réaction. La réaction présentée à la Figure 40, se déroule comme suit :

- EDC réagit avec les COOH du CMD pour former un ester intermédiaire actif, mais instable (O-acylisourea) (Figure 40.b).
- L'ester instable réagit avec NHS pour former un ester-NHS beaucoup plus stable, réduisant ainsi les réactions secondaires (Figure 40.c).
- L'ester-NHS réagit avec NH_2 pour former un lien amide par libération du NHS (Figure 40.c).

Malgré tout, des réactions secondaires peuvent avoir lieues majoritairement entre l'EDC et NHS. Il est donc nécessaire lors de la synthèse d'un lien amide, d'introduire EDC et NHS en excès par rapport à l'acide carboxylique (Figure 41). De plus, l'activité des composés intermédiaires dépend du pH. Celui-ci peut donc être contrôlé afin d'améliorer l'efficacité de la réaction comme le montre la Figure ci-dessous :

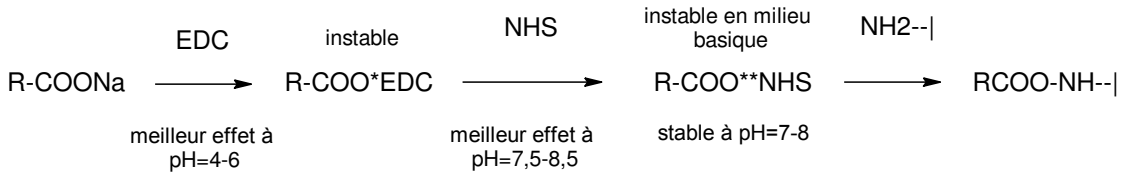


Figure 39 : Efficacité de l'action de EDC et NHS en fonction du pH.[154,198,199]

Dans ce travail, la réaction de greffage du CMD avec les surfaces aminées s'est produite à pH=7,4, afin d'améliorer l'activité de l'ester-NHS. A ce pH, une fois la surface immergée, les amines sont sous forme ionisée

si on considère pKa(NH_3^+/NH_2)=9.5 (sur un acide aminé). Des liaisons ioniques peuvent alors se former entre les NH_3^+ et les COOH. Afin de s'assurer de ne conserver que les CMD greffés de façon covalente à la fin de la réaction de greffage, les surfaces greffées sont rincées avec du NaCl qui permet de séparer les paires d'ions.

La méthodologie du greffage du CMD est présentée dans le chapitre 4.4.1 et discutée dans le chapitre 6.1.

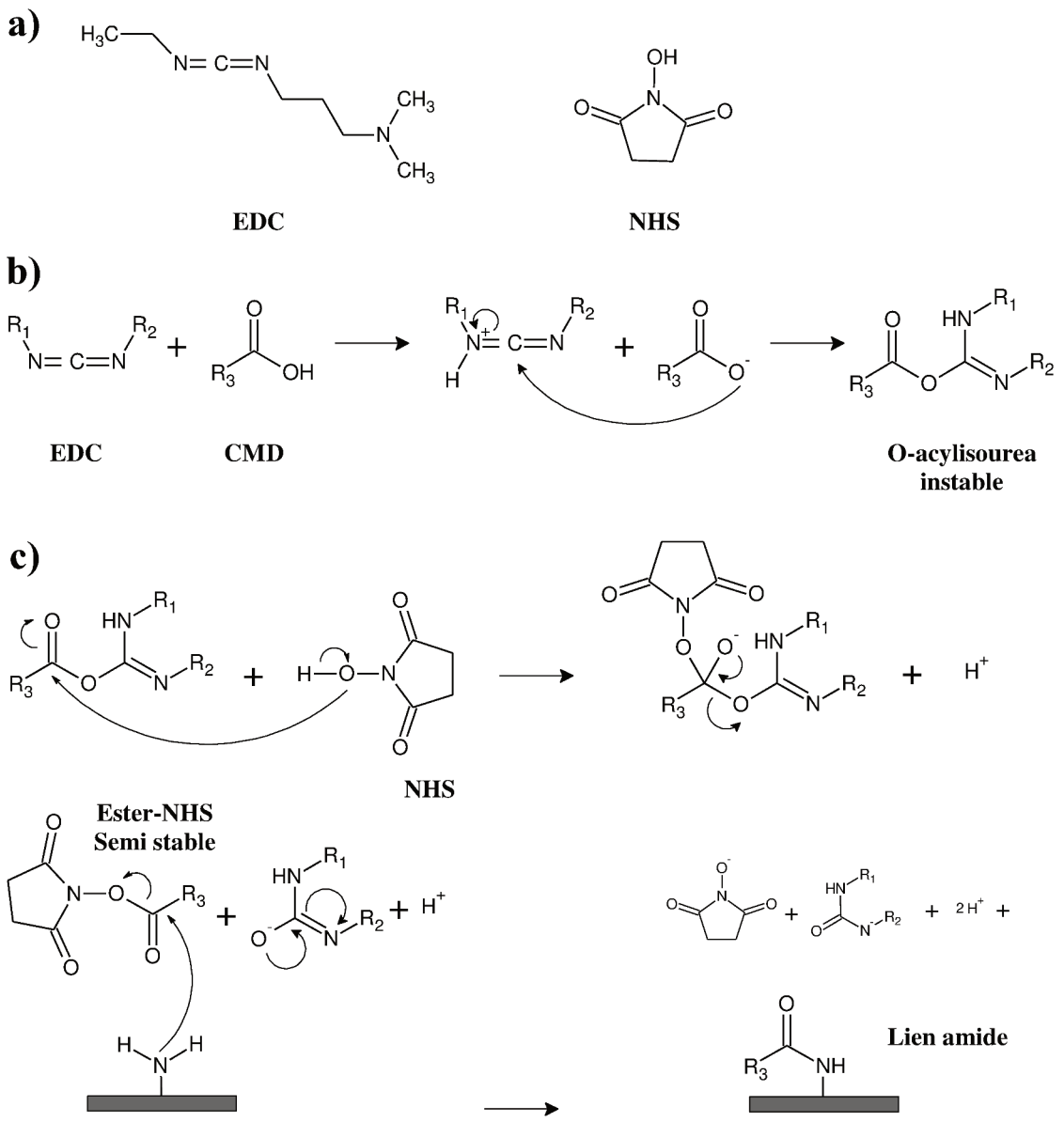


Figure 40 : Greffage du CMD aux surfaces aminées avec EDC et NHS. a) structures d'EDC et NHS. b) couplage de EDC avec CMD pour former un ester instable, le O-acylisourea. c) couplage avec NHS pour former un ester-NHS plus stable qui va réagir avec les amines de la surface pour former un lien amide. $R_1 = C_2H_5$; $R_2 = (C_2H_6)\text{-}N(CH_3)_2$; $R_3 = CH_2\text{-CMD}$.

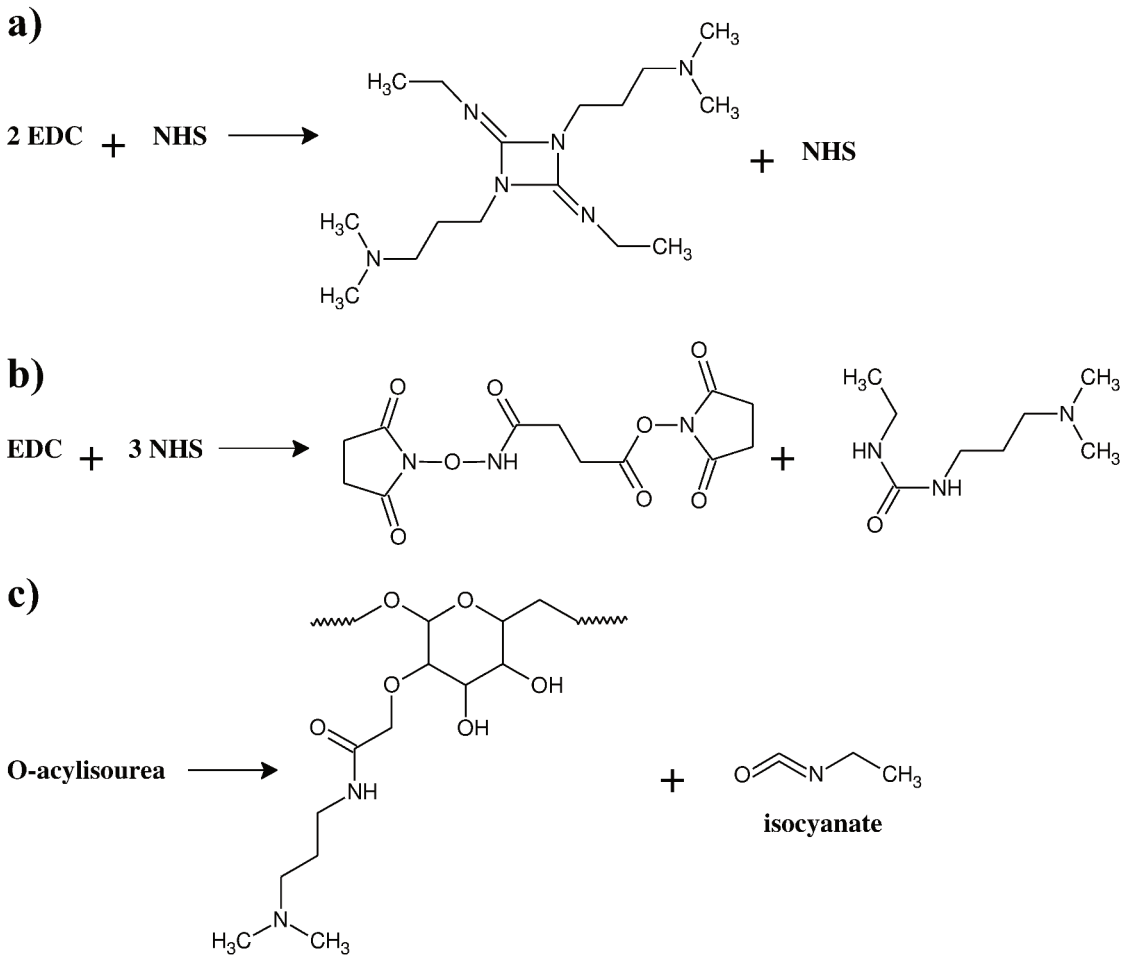


Figure 41 : Formation de produits secondaires lors du greffage du CMD avec EDC/NHS. EDC et NHS peuvent réagir entre eux pour former des composés secondaires (a et b)[198,199] et l'ester instable O-acylisourea, formé après coulage du CMD avec EDC, peut réarranger ses liaisons et former un amide et de l'isocyanate (c).[154]

8.2. La purification du CMD

Lors de la réaction de carboxyméthylation plusieurs acides sont mis en jeu :

- L'acide monochloroacétique : réagit avec les chaînes de dextrane pour substituer un CH_2-COOH à un H et former le carboxyméthyldextrane (CMD).
- L'acide glycolique : qui est formé parallèlement par la réaction de l'acide monochloroacétique avec le NaOH.
- L'acide acétique : permet de neutraliser la solution de CMD basique avant précipitation.

Comme expliqué au chapitre 6.2.2, afin d'éliminer ces acides il est nécessaire de faire plusieurs dissolutions et précipitations des chaînes de CMD. La méthodologie est présentée dans la Figure 38. La Figure 42 présente l'analyse RMN-^{1}H du CMD après chaque étape. Les pics d'acide monochloroacétique, glycolique et acétique sont présents à 3,97, 3,95 et 1,94 ppm, respectivement. On peut observer la disparition de ces après 2 processus de dissolution/précipitations.

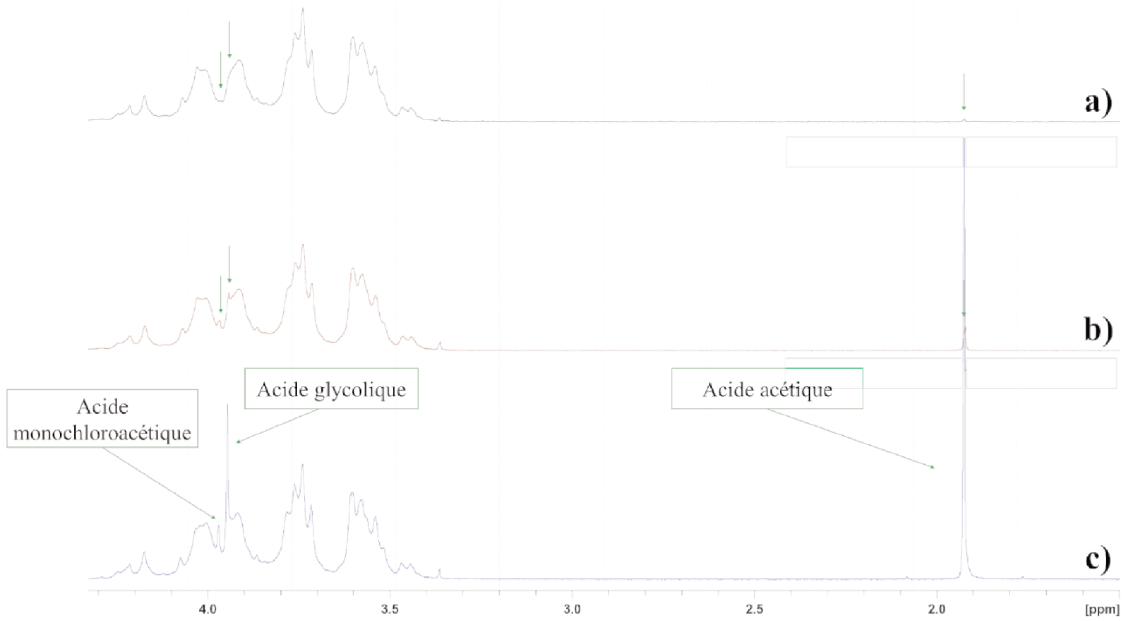


Figure 42 : Spectre RMN-^{1}H du CMD 0.2 à chaque étape de purification avec disparition des pics d'acides. a) après la première précipitation, rinçage à l'éther diéthylique et séchage sous vide, b) après la première re-dissolution, c) après la seconde re-dissolution.

Suite aux multiples précipitations, la présence de méthanol et d'éther diéthylique a aussi été observée en RMN-^{1}H (Figure 43). La précipitation des chaînes de CMD dans l'éthanol, bien moins toxique pour l'organisme que le méthanol, a été envisagée, mais les chaînes précipitaient moins bien. Finalement, en effectuant les re-dissolutions à chaud (40°C) et avec un séchage sous vide à 50°C, les solvants ont pu être éliminés.

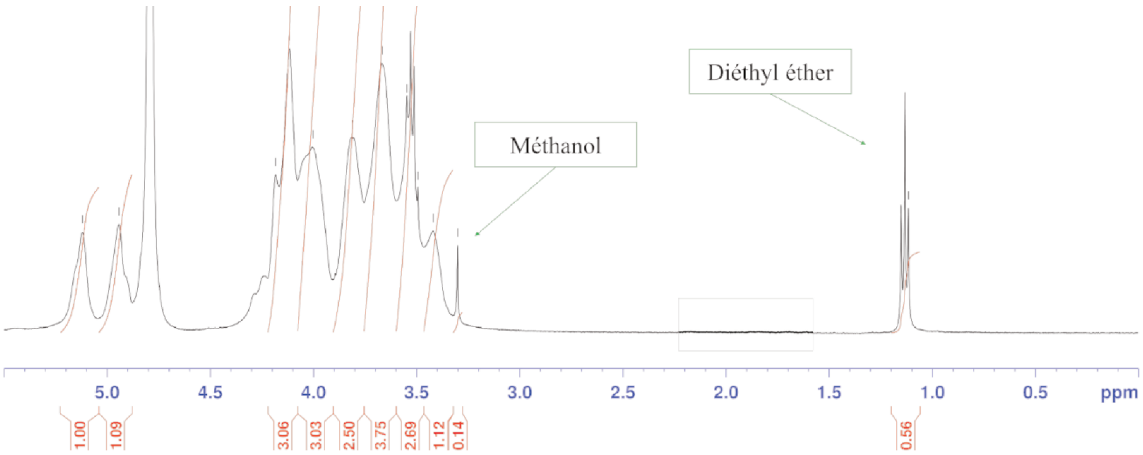
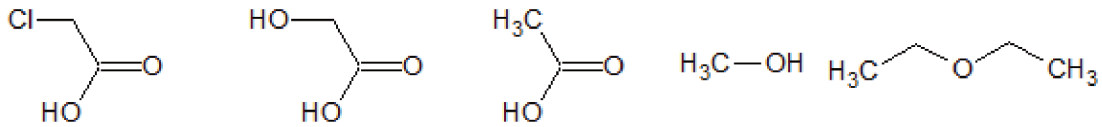


Figure 43 : Spectre RMN-^{1}H du CMD 1.3 après 2 étapes de dissolution/précipitation à température ambiante. Les pics du méthanol et d'éther diéthylique sont observés à 3,30 ppm et 1,15-1,12 ppm, respectivement.



Acide monochloroacétique | Acide glycolique | Acide acétique | Méthanol | Ether diéthylique

Figure 44 : Formules chimiques des contaminants du CMD.

8.3. La purification du CMD-PBMA

La synthèse du copolymère CMD-PBMA s'effectue par copolymérisation radicalaire libre à partir d'ions cérium(IV) en milieu acide. Lors de cette synthèse, plusieurs produits dérivés sont formés, provenant de molécules n'ayant pas réagi ou de produits de synthèse, et doivent être éliminés afin d'obtenir un copolymère de CMD-PBMA pur. Outre l'élimination de contaminants, les multiples étapes de purification doivent aussi permettre aussi de conserver le polymère sous forme de poudre fine. Le chapitre 5 présente la méthode de synthèse et de purification des copolymères CMD-PBMA, et le chapitre 6.2.3 discute de l'importance d'obtenir le copolymère sous forme de poudre fine. Pour ce qui est de la purification, les étapes de lavages s'effectuant dans des non-solvants du copolymère, plus fines seront les particules, plus facile sera l'élimination des contaminants. Toutefois, la taille des particules doivt être suffisante pour pouvoir récupérer les polymères.

Les contaminants produits lors de la synthèse du CMD-PBMA sont éliminés selon 3 types de lavages : une précipitation dans l'éthanol, un lavage en phase aqueuse et une extraction en phase organique.

Précipitation dans l'éthanol

Après synthèse la mixture obtenue contient principalement des chaînes de copolymères de CMD-PBMA ainsi que des chaînes d'homopolymère de PBMA en suspension dans une solution aqueuse. La mixture est concentrée et précipitée dans de l'éthanol afin de récupérer les chaînes de polymères comme le CMD-PBMA, le PBMA ou encore le CMD (l'éthanol est un non-solvant de ces polymères). De plus, les éventuels monomères de BMA n'ayant pas réagi sont contenus dans le mélange eau/éthanol ou encore une partie des ions de la réaction comme les ions provenant du milieu de synthèse acide et de la réaction avec le nitrate d'ammonium et de cérium (NO_3^-, H_3O^+, NH_4^+, Ce^{3+}, Ce^{4+}). Le copolymère forme alors une sorte de « gel collant » avec les macromolécules agglutinées, gonflées d'éthanol, qui n'est pas filtrable. Le copolymère est donc laissé à décanter dans l'éthanol (Figure 45.a) et le surnageant est éliminé. Le gel de polymères est ensuite transféré dans des tubes de centrifugation pour l'étape de lavage en phase aqueuse. Pour la suite de ce travail, la méthodologie de lavage consiste à ajouter le solvant désiré, agiter la mixture sous vortex, puis centrifuger pour séparer la phase solide et la phase liquide et enfin éliminer le surnageant (phase liquide).

Lavage en phase aqueuse

L'objectif du lavage en phase aqueuse est d'éliminer les ions restants, principalement les ions cérium(III) et les CMD n'ayant pas réagi. En premier lieu, une solution d'EDTA est ajoutée aux macromolécules dans le reste d'éthanol. L'eau de la solution d'EDTA, étant un meilleur non-solvant pour les polymères, permet de conserver de fines particules et d'éviter l'agglutination des chaînes par une centrifugation directe des chaînes dans l'éthanol. Les macromolécules sont deux fois lavées par une solution d'EDTA par vortex et centrifugation. L'EDTA est un chélatant fort qui forme un complexe stable avec les ions Ce(IV), permettant de rompre les possibles interactions entre les ions et les chaînes de copolymère et donc de mieux les éliminer (Figure 45.b). La présence de cérium dans le copolymère final peut-être déterminée par XPS. De même façon, les macromolécules sont ensuite 3 fois lavées à l'eau. Le rendement de synthèse de CMD-PBMA étant faible, la séparation des phases a préférentiellement été faite par centrifugation que par filtration pour éviter un maximum de perte. Le produit résultant, contenant du CMD-PBMA et de l'homopolymère PBMA, est mis à lyophiliser. Encore une fois la lyophilisation permet de conserver des particules fines et de mieux sécher le produit, contrairement à un séchage sous vide à chaud. En effet, le PBMA étant un thermoplastique avec une température de transition vitreuse (Tg) proche de 30°C, les chaînes durcissent et forment un réseau solide.

Extraction en phase organique

L'homopolymère de PBMA formé est séparé du copolymère CMD-PBMA par l'acétone, solvant du PBMA, dans un extracteur Soxhlet. La poudre précédemment produite contenant le copolymère CMD-PBMA et l'homopolymère PBMA, est introduite dans une cartouche de cellulose perméable aux chaînes de PBMA dissoutes dans l'acétone à reflux (Figure 45.c). L'extraction est grandement améliorée si le produit à extraire est une poudre très fine. D'après les travaux précédents,[141,142] le temps d'extraction a été fixé à 12 h (une nuit). Le copolymère purifié est ensuite récupéré. Il s'agit de l'étape la plus délicate quant à la mise en forme du

copolymère, car celui-ci contient en majorité des chaînes PBMA qui gonflent avec l'acétone et transforme le copolymère en « gel » colloïde très visqueux. Afin d'éliminer l'acétone, il nécessaire de rincer le copolymère avec de l'eau. Cependant, au contact de l'eau (non-solvant plus fort) les chaînes de copolymère gonflées d'acétone s'agglutinent et durcissent immédiatement, formant une sorte de gomme dure. Afin de former une poudre fine, une méthode de précipitation « inversée » a été mise en place dans ce travail. En effet, la précipitation d'une suspension de copolymère/acétone dans de l'eau ne permet pas de récupérer les macromolécules. De ce fait, le copolymère est d'abord transféré de la cartouche de cellulose dans un tube de centrifugation avec de l'acétone et laissé à décanter (env. 20 mL). Le copolymère est ensuite précipité en alternant l'ajout de quelques gouttes d'eau et une agitation au vortex, plusieurs fois. L'acétone est alors éliminée par lavage à l'eau et le copolymère forme de fines particules blanches (Figure 45.d) qui sont par la suite lyophilisées.

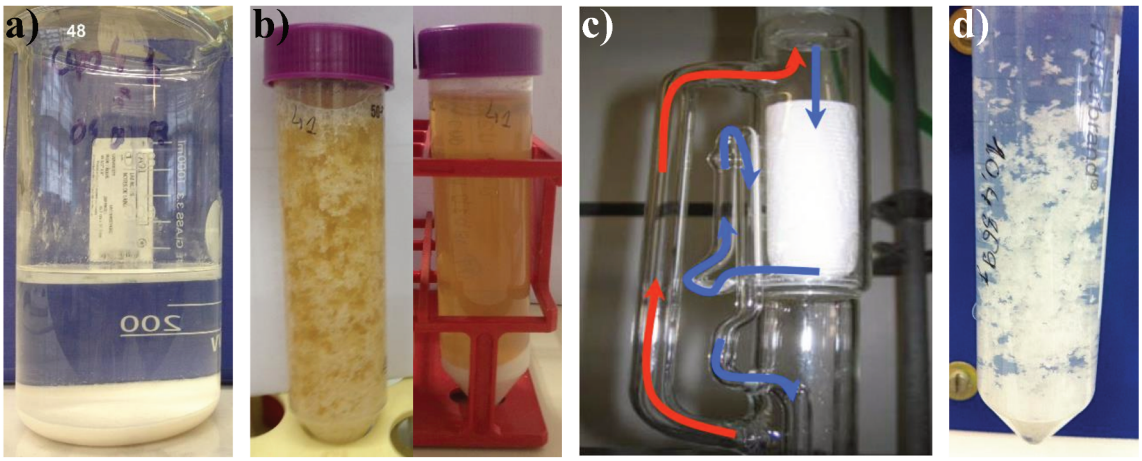


Figure 45 : Les étapes de purification du copolymère CMD-PBMA. a) copolymère sous forme de gel décanté après précipitation dans l'éthanol, b) lavage à l'EDTA avant et après centrifugation, c) extraction au Soxhlet par vapeur d'acétone (ligne rouge) et condensation solubilisant l'homopolymère de PBMA (ligne bleue), d) précipitation du copolymère dans acétone/eau après extraction au Soxhlet.

8.4. Adhérence des cellules musculaires lisses et endothéliales en co-culture

<u>Méthode</u> :

Surfaces : les tests ont été effectués sur des films de CMD-PBMA 3 et 4 et le verre a été utilisé comme contrôle positif. Les surfaces ont été préparées et stérilisées dans des plaques de 24-puits comme dans le chapitre 5.4.

Culture cellulaire : Les cellules endothéliales (HUVEC) et musculaires lisses (HUASMC) ont été cultivées et ensemencées de même façon que dans le chapitre 4.4.5. Les inserts (Ibidi, #80209) ont été collés sur les surfaces et 40 000 HUVEC/cm² et 15 000 HUASMC/cm² dans du milieu de culture ont été déposées dans chaque puits

puis mises à incuber à 37°C. 2 monocultures et une co-culture ont été effectuées comme présentée dans la Figure 46. Après 24h, les inserts ont été retirés, une partie des cellules sont remises à incuber avec du milieu de culture à 37°C et une partie est fixée et marquée aux DAPI et Rodhamine-phalloïdine (protocole chapitre 5.4.8.4). Après 4 jours, les cellules ont été fixées et marquées aux DAPI et Rodhamine-phalloïdine. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence.

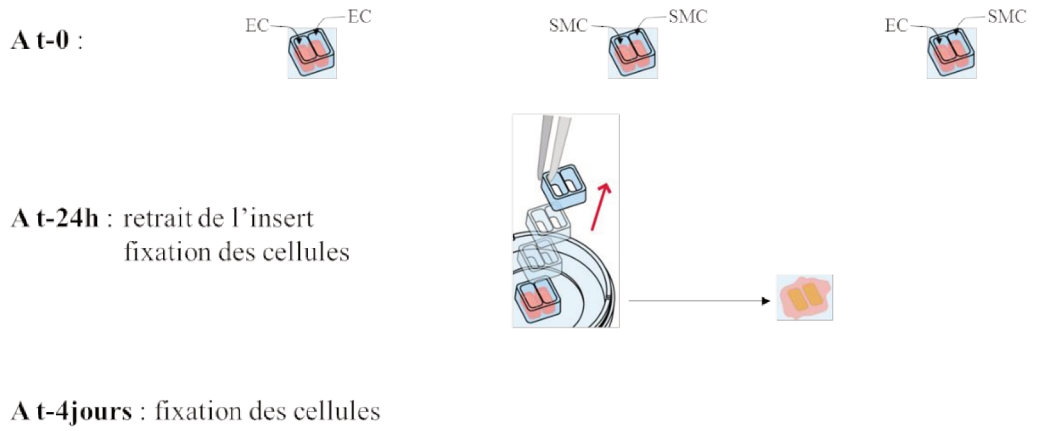


Figure 46 : Méthode de culture cellulaire avec insert avec co-culture de HUVEC et HUASMC. Comme contrôles, deux monocultures de HUVEC (EC) et de HUASMC (SMC) sont faites.

<u>Résultats</u> :

A 24h sur le verre, pour toutes les cultures, les cellules sont adhérées et la marque laissée par l'insert est bien visible. Pour le copolymère, les résultats observés sont les mêmes que le CMD-PBMA 3 et 4 et pour tous les types de cultures et de cellules. Quelques cellules adhérées ont été observées, mais ne sont pas étalées. Majoritairement, aucune cellule n'est observée ou alors sous forme de grappe.

A 4 jours, sur le verre les monocultures montrent une prolifération et une migration des cellules qui comblent la raie laissée par l'insert. Pour la co-culture SMC/EC, les cellules prolifèrent aussi cependant la migration des HUASMCs est plus importante que celles des HUVECs. Pour les CMD-PBMA, aucune cellule n'est observée quelques rares grappes sont encore présentes.

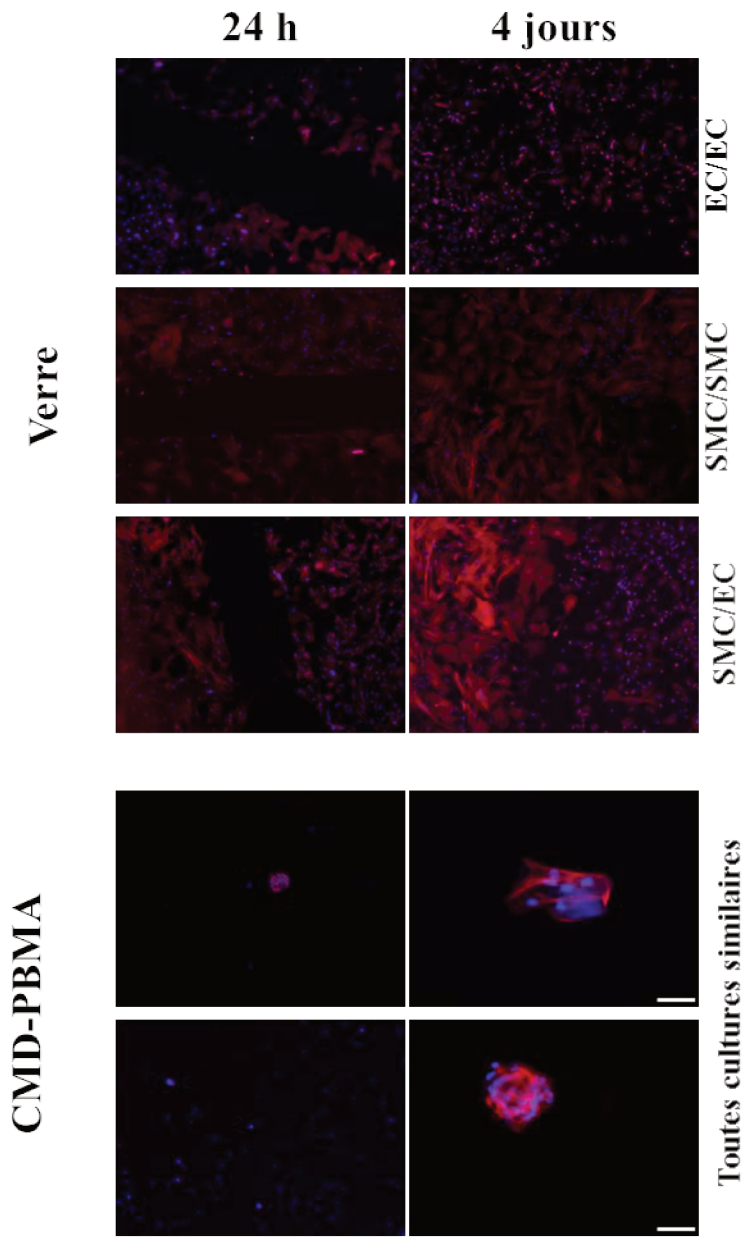


Figure 47 : Adhérence et prolifération des HUVECs et HUASMCs en co-culture. Les microscopies présentées pour le CMD-PBMA sont représentatives pour les deux copolymères CMD-PBMA 3 et 4 et pour toutes les cultures (EC/EC, SMC/SMC, EC/SMC). Les images sans échelle représentent une image de 450,6 µm de longueur, les barres d'échelles représentent 50 µm.

8.5. Autres tests préliminaires d'adhérence sur les films de CMD-PBMA

Certains tests préliminaires ont été effectués sur des films de CMD-PBMA et montrent des résultats prometteurs quant aux propriétés anti-adhérentes de ces copolymères. Pour les tests suivant les échantillons ont été stérilisés par éthanol pur et rincés au PBS avant ensemencement des cellules dans des plaques de cultures. La culture des cellules présentées a été effectuée à 37°C dans des conditions classiques.

Test 1.a : Adhérence des HUVECs avec pré-immersion des surfaces dans du milieu

Intérêt : Est-ce que l'adsorption possible des protéines du milieu améliore l'adhérence ?
Ensemencement : immersion des surfaces 24h dans du milieu contenant 10% FBS puis ajout 5 000 HUVECs/cm²
Culture : 2 h
Contrôle : fond de plaque
Analyse : contraste de phase
Observations : pas de cellules adhérées. La pré-immersion ne change pas l'adhérence cellulaire.

Test 1.b : Adhérence des HUVECs avec pré-immersion des surfaces dans du milieu et plus de cellules

Intérêt : Est-ce que l'adsorption possible des protéines est améliorée par plus de protéines ? Est-ce avec plus de cellules, une partie « préparer » la surface pour une meilleure adhérence des suivantes ?
Ensemencement : immersion des surfaces 24h dans du milieu contenant 100% FBS puis ajout 5 000/10 000/100 000 HUVECs/cm²
Culture : 2 h
Contrôle : fond de plaque
Analyse : contraste de phase
Observations : pas de cellules adhérées. Ni la pré-immersion, ni la concentration de cellules ne changent pas l'adhérence cellulaire.

Test 2 : Adhérence des HeLa

Intérêt : Est-ce que les propriétés anti-adhérentes sont transférées aux cellules cancéreuses HeLa?
Ensemencement : 15 000 HeLa/cm²
Culture : 2 h
Contrôle : fond de plaque
Analyse : contraste de phase
Observations : pas de cellules adhérées.

Test 3 : Adhérence des staphylococcus aureus et escherichia coli

Intérêt : Est-ce que les propriétés anti-adhérentes sont transférées aux bactéries GRAM + et GRAM -?
Ensemencement : 1.5 10^6 UFC/mL
Culture : 24 h
Contrôle : verre, silicone et PBMA
Analyse : Comptage de colonies et live/dead
Observations : Adhérence limitée par rapport au PBMA seul et similaire au silicone. Résultats similaires pour les 2 types de bactéries

9. Références

1. The cardiovascular system. at <http://www.abacon.com/dia/exphys/five.html>
2. Sanofi-Aventis. Structure d'une artère. at <http://www.adetec-coeur.fr/maladies_des_arteres_coronaires>
3. World Health Organization. Maladies cardiovasculaires, Janvier 2015. 1–6 (2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>
4. World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2014. (World Health Organization, 2014). at <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2014/en/>
5. Encyclopædia Britannica Inc. Atherosclerosis. at <http://www.britannica.com/science/atherosclerosis>
6. Lusis, A. J. Atherosclerosis. Nature **407,** 233–241 (2000).
7. Libby, P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. Am. J. Cardiol. **86,** 3–8 (2000).
8. Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W. J., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. & Wissler, R. W. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation **92,** 1355–1374 (1995).
9. Hansson, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N. Engl. J. Med. **352,** 1685–1695 (2005).
10. Grüntzig, A. R., Senning, Å. & Siegenthaler, W. E. Nonoperative Dilatation of Coronary-Artery Stenosis. N. Engl. J. Med. **301,** 61–68 (1979).
11. Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., Joffre, F. & Kappenberger, L. Intravascular Stents to Prevent Occlusion and Re-Stenosis after Transluminal Angioplasty. N. Engl. J. Med. **316,** 701–706 (1987).
12. Lowe, H. C., Oesterle, S. N. & Khachigian, L. M. Coronary in-stent restenosis: Current status and future strategies. J. Am. Coll. Cardiol. **39,** 183–193 (2002).
13. ©Healthwise, Incorporated. at <http://www.emedicinehealth.com>
14. Fuji-Keizai USA. Next Generation Biomaterials/BioMedical Devices: U.S. & EU Market Trends & Commercial Implications. (2010). at <http://www.researchandmarkets.com/reports/1408650/next_generation_biomaterials_biomedical_devices>
15. Blanchard, D. Évolution de la cardiologie interventionnelle et des stents en France et en Europe. Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris). **56,** S42–S47 (2007).
16. Koncept Analytics. Global Coronary Stent Market Report: 2010 Edition. (2010). at <http://www.researchandmarkets.com/reports/1301344/global_coronary_stent_market_report_2010_edition>
17. Bambauer, R., Mestres, P., Schiel, R., Bambauer, S., Sioshansi, P. & Latza, R. Long-term Catheters for Apheresis and Dialysis with Surface Treatment with Infection Resistance and Low Thrombogenicity. Ther. Apher. Dial. **7,** 225–231 (2003).
18. Curtis, J. & Klykken, P. A Comparative Assessment of Three Common Catheter Materials. Dow Corning 1–8 (2008). at <http://www1.dowcorning.com/content/publishedlit/52-1116.pdf>
19. Access Technologies. Catheter tubing. 1–29 (2014).
20. Chakfé, N., Dieval, F., Thaveau, F., Rinckenbach, S., Hassani, O., Camelot, G., Durand, B. & Kretz, J.-G. Substituts vasculaires. Ann. Chir. **129,** 301–309 (2004).
21. Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K. & Mantovani, D. Small-diameter vascular tissue engineering. Nat. Rev. Cardiol. **10,** 410–421 (2013).
22. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G. & Seifalian, A. M. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. **74,** 570–81 (2005).
23. Maquet Getinge Group. Vascular and Cardiothoracic Surgery Solutions. 1–28 (2012).
24. Riepe, G., Heintz, C., Kaiser, E., Chakfé, N., Morlock, M., Delling, M. & Imig, H. What can we Learn from Explanted Endovascular Devices? Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. **24,** 117–122 (2002).
25. Butany, J. Coronary artery stents: identification and evaluation. J. Clin. Pathol. **58,** 795–804 (2005).
26. Dupouy, P., Aptecar, E., Belarbi, A., Lanoue, I., Lespès, M., Pernès, J., Teiger, E. & Veyssière, F.

Stents coronaires : de la conception à l ' utilisation. Sang Thromb. Vaiss. **12,** 89–96 (2000).
27. Mani, G., Feldman, M. D., Patel, D. & Agrawal, C. M. Coronary stents: A materials perspective. Biomaterials **28,** 1689–1710 (2007).
28. Hindlet, P., Fargeot, C., Juliard, J.-M. J.-M. & Farinotti, R. Endoprothèses coronaires : critères de choix et élaboration d'une fiche technique type. J. Pharm. Clin. **24,** 40–46 (2005).
29. O'Brien, B. & Carroll, W. The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: A review. Acta Biomater. **5,** 945–958 (2009).
30. Grainger, D. W. All charged up about implanted biomaterials. Nat. Biotechnol. **31,** 507–509 (2013).
31. Sigler, M., Paul, T. & Grabitz, R. G. Biocompatibility screening in cardiovascular implants. Z. Kardiol. **94,** 383–391 (2005).
32. Schwartz, R. S., Holmes, D. R. & Topol, E. J. The restenosis paradigm revisited: An alternative proposal for cellular mechanisms. J. Am. Coll. Cardiol. **20,** 1284–1293 (1992).
33. Baddour, L. M. Nonvalvular Cardiovascular Device-Related Infections. Circulation **108,** 2015–2031 (2003).
34. Costerton, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science (80-.). **284,** 1318–1322 (1999).
35. Rensing, B. J., Hermans, W. R., Strauss, B. H. & Serruys, P. W. Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study. J. Am. Coll. Cardiol. **17,** 34B–38B (1991).
36. Schwartz, R. S., Topol, E. J., Serruys, P. W., Sangiorgi, G. & Holmes, D. R. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. J. Am. Coll. Cardiol. **32,** 2087–94 (1998).
37. Pasterkamp, G. & Smits, P. C. Remodelling of Coronary Arteries. Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. **9,** 229–235 (2002).
38. Kivelä, A. & Hartikainen, J. Restenosis related to percutaneous coronary intervention has been solved? Ann. Med. **38,** 173–187 (2006).
39. Chang, C. C. & Ong, E. T. Coronary restenosis. Acta Cardiol. Sin. **21,** 177–189 (2005).
40. Toth, J. Adsorption: Theory, Modeling, and Analysis. (Marcel Dekker, 2002).
41. Murphy-Ullrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? J. Clin. Invest. **107,** 785–790 (2001).
42. An, Y. H. & Friedman, R. J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J. Biomed. Mater. Res. **43,** 338–348 (1998).
43. Katsikogianni, M. & Missirlis, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. Eur. Cell. Mater. **8,** 37–57 (2004).
44. Habimana, O., Semião, A. J. C. & Casey, E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. J. Memb. Sci. **454,** 82–96 (2014).
45. Wieneke, H., Sawitowski, T., Wnendt, S., Fischer, A., Dirsch, O., Karoussos, I. A. & Erbel, R. Stent coating: a new approach in interventional cardiology. Herz **27,** 518–26 (2002).
46. Hara, H., Nakamura, M., Palmaz, J. C. & Schwartz, R. S. Role of stent design and coatings on restenosis and thrombosis. Adv. Drug Deliv. Rev. **58,** 377–386 (2006).
47. Sydow-Plum, G. & Tabrizian, M. Review of stent coating strategies: clinical insights. Mater. Sci. Technol. **24,** 1127–1143 (2008).
48. Davenas, J., Thévenard, P., Philippe, F. & Arnaud, M. . Surface implantation treatments to prevent infection complications in short term devices. Biomol. Eng. **19,** 263–268 (2002).
49. Ding, X., Yang, C., Lim, T. P., Hsu, L. Y., Engler, A. C., Hedrick, J. L. & Yang, Y.-Y. Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-b-cationic polycarbonate diblock copolymers. Biomaterials **33,** 6593–6603 (2012).
50. Ratner, B. D. & Bryant, S. J. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. Annu. Rev. Biomed. Eng. **6,** 41–75 (2004).
51. Hadjizadeh, A. Acetaldehyde plasma polymer-coated PET fibers for endothelial cell patterning: Chemical, topographical, and biological analysis. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. **94,** 11–21 (2010).
52. McLean, K. M., Johnson, G., Chatelier, R. C., Beumer, G. J., Steele, J. G. & Griesser, H. J. Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. Colloids Surfaces B Biointerfaces **18,** 221–234 (2000).

53. Li, M., Neoh, K. G., Xu, L. Q., Wang, R., Kang, E.-T., Lau, T., Olszyna, D. P. & Chiong, E. Surface Modification of Silicone for Biomedical Applications Requiring Long-Term Antibacterial, Antifouling, and Hemocompatible Properties. Langmuir **28,** 16408–16422 (2012).
54. Yeh, S.-B., Chen, C.-S., Chen, W.-Y. & Huang, C.-J. Modification of Silicone Elastomer with Zwitterionic Silane for Durable Antifouling Properties. Langmuir **30,** 11386–11393 (2014).
55. Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J. D. & Jiang, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. Biomaterials **28,** 4192–4199 (2007).
56. Diaz Blanco, C., Ortner, A., Dimitrov, R., Navarro, A., Mendoza, E. & Tzanov, T. Building an Antifouling Zwitterionic Coating on Urinary Catheters Using an Enzymatically Triggered Bottom-Up Approach. ACS Appl. Mater. Interfaces **6,** 11385–11393 (2014).
57. Lewis, A. L. Phosphorylcholine-based polymers and their use in the prevention of biofouling. Colloids Surfaces B Biointerfaces **18,** 261–275 (2000).
58. Ishihara, K., Tsuji, T., Kurosaki, T. & Nakabayashi, N. Hemocompatibility on graft copolymers composed of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) side chain and poly(n-butyl methacrylate) backbone. J. Biomed. Mater. Res. **28,** 225–232 (1994).
59. Lew, W. & Moore, W. Antibiotic-Impregnated Grafts for Aortic Reconstruction. Semin. Vasc. Surg. **24,** 211–219 (2011).
60. Salacinski, H. J., Goldner, S., Guidiceandrea, A., Hamilton, G., Seifalian, A. M., Edwards, A. & Carson, R. J. The Mechanical Behavior of Vascular Grafts: A Review. J. Biomater. Appl. **15,** 241–278 (2001).
61. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Biomaterials **24,** 4385–4415 (2003).
62. Hadjizadeh, A., Doillon, C. J. & Vermette, P. Bioactive Polymer Fibers to Direct Endothelial Cell Growth in a Three-Dimensional Environment. Biomacromolecules **8,** 864–873 (2007).
63. Tan, Q., Ji, J., Barbosa, M. ., Fonseca, C. & Shen, J. Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. Biomaterials **24,** 4699–4705 (2003).
64. Wiemer, M., Butz, T., Schmidt, W., Schmitz, K.-P., Horstkotte, D. & Langer, C. Scanning electron microscopic analysis of different drug eluting stents after failed implantation: From nearly undamaged to major damaged polymers. Catheter. Cardiovasc. Interv. **75,** 905–911 (2010).
65. Levy, Y., Mandler, D., Weinberger, J. & Domb, A. J. Evaluation of drug-eluting stents' coating durability-Clinical and regulatory implications. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **91B,** 441–451 (2009).
66. Chu, P. Plasma-surface modification of biomaterials. Mater. Sci. Eng. R Reports **36,** 143–206 (2002).
67. Bueno, H. in Med. device Mater. Proc. from Mater. Process. Med. Devices Conf. 8-10 Sept. 2003, Anaheim, Calif. (ed. Shrivastava, S.) 99 (ASM International, 2005).
68. Qiu, J. H. Passivity and its breakdown on stainless steels and alloys. Surf. Interface Anal. **33,** 830–833 (2002).
69. Köster, R., Vieluf, D., Kiehn, M., Sommerauer, M., Kähler, J., Baldus, S., Meinertz, T. & Hamm, C. W. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis. Lancet **356,** 1895–1897 (2000).
70. Metals handbook Desk edition. (ASM International, 1999).
71. Goodfellow. Propriétés des matériaux - Alliage. (2011). at <http://www.goodfellow.com/>
72. Haïdopoulos, M., Turgeon, S., Laroche, G. & Mantovani, D. Surface modifications of 316 stainless steel for the improvement of its interface properties with RFGD-deposited fluorocarbon coating. Surf. Coatings Technol. **197,** 278–287 (2005).
73. Lewis, F., Horny, P., Hale, P., Turgeon, S., Tatoulian, M. & Mantovani, D. Study of the adhesion of thin plasma fluorocarbon coatings resisting plastic deformation for stent applications. J. Phys. D. Appl. Phys. **41,** 045310 (2008).
74. Touzin, M., Chevallier, P., Lewis, F., Turgeon, S., Holvoet, S., Laroche, G. & Mantovani, D. Study on the stability of plasma-polymerized fluorocarbon ultra-thin coatings on stainless steel in water. Surf. Coatings Technol. **202,** 4884–4891 (2008).
75. Holvoet, S., Chevallier, P., Turgeon, S. & Mantovani, D. Toward High-Performance Coatings for Biomedical Devices: Study on Plasma-Deposited Fluorocarbon Films and Ageing in PBS. Materials (Basel). **3,** 1515–1532 (2010).
76. d'Agostino, R., Favia, P., Fracassi, F. & Illuzzi, F. The effect of power on the plasma-assisted

deposition of fluorinated monomers. J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. **28,** 3387–3402 (1990).
77. Ombelli, M., Eckmann, D. M. & Composto, R. J. Biomimetic Dextran Coatings On Silicon Wafers: Thin Film Properties And Wetting. MRS Proc. **734,** B10.7 (2002).
78. Meng, S., Liu, Z., Shen, L., Guo, Z., Chou, L. L., Zhong, W., Du, Q. & Ge, J. The effect of a layer-by-layer chitosan–heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. Biomaterials **30,** 2276–2283 (2009).
79. Barrera, C., Herrera, A., Zayas, Y. & Rinaldi, C. Surface modification of magnetite nanoparticles for biomedical applications. J. Magn. Magn. Mater. **321,** 1397–1399 (2009).
80. Dai, L., StJohn, H. A. W., Bi, J., Zientek, P., Chatelier, R. C. & Griesser, H. J. Biomedical coatings by the covalent immobilization of polysaccharides onto gas-plasma-activated polymer surfaces. Surf. Interface Anal. **29,** 46–55 (2000).
81. Yang, Z., Wang, J., Luo, R., Maitz, M. F., Jing, F., Sun, H. & Huang, N. The covalent immobilization of heparin to pulsed-plasma polymeric allylamine films on 316L stainless steel and the resulting effects on hemocompatibility. Biomaterials **31,** 2072–2083 (2010).
82. Chen, Q. D., Dai, L. M., Gao, M., Huang, S. M. & Mau, a. Plasma activation of carbon nanotubes for chemical modification. J. Phys. Chem. B **105,** 618–622 (2001).
83. Vallières, K., Chevallier, P., Sarra-Bournet, C., Turgeon, S. & Laroche, G. AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation? Langmuir **23,** 9745–9751 (2007).
84. Chevallier, P., Castonguay, M., Turgeon, S., Dubrulle, N., Mantovani, D., McBreen, P. H., Wittmann, J. C. & Laroche, G. Ammonia RF - Plasma on PTFE surfaces: Chemical characterization of the species created on the surface by vapor - Phase chemical derivatization. J. Phys. Chem. B **105,** 12490–12497 (2001).
85. Gauvreau, V., Chevallier, P., Vallières, K., Petitclerc, É., Gaudreault, R. C. & Laroche, G. Engineering Surfaces for Bioconjugation: Developing Strategies and Quantifying the Extent of the Reactions. Bioconjug. Chem. **15,** 1146–1156 (2004).
86. Chupa, J. M., Foster, A. M., Sumner, S. R., Madihally, S. V. & Matthew, H. W. . Vascular cell responses to polysaccharide materials: Biomaterials **21,** 2315–2322 (2000).
87. Thierry, B., Winnik, F. M., Merhi, Y., Silver, J. & Tabrizian, M. Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. Biomacromolecules **4,** 1564–1571 (2003).
88. McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W. & Stone, A. P. Rheological properties of dextran related to food applications. Food Hydrocoll. **8,** 609–623 (1994).
89. Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. J. Chem. Technol. Biotechnol. **80,** 845–860 (2005).
90. Lindberg, B. & Svensson, S. Structural Studies on Dextran from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512. Acta Chem. Scand. **22,** 1907–1912. (1968).
91. Antonini, E., Bellelli, L., Bruzzesi, M. R., Caputo, A., Chiancone, E. & Rossi-Fanelli, A. Studies on dextran and dextran derivatives. I. Properties of native dextran in different solvents. Biopolymers **2,** 27–34 (1964).
92. Abir, F., Barkhordarian, S. & Sumpio, B. E. Efficacy of dextran solutions in vascular surgery. Vasc. Endovascular Surg. **38,** 483–91 (2004).
93. Haught, W. H., Sokol, M., Kerensky, R. A. & Mehta, J. L. Decrease in hematocrit after coronary stent placement and dextran therapy. Am. J. Cardiol. **76,** 314–5 (1995).
94. Chang, R. L., Crawford, M. P. & West, M. D. An assessment of the potential use of anionic dextrans as a plasma substitute. J. Biomed. Eng. **2,** 41–4 (1980).
95. Logeart-Avramoglou, D. & Jozefonvicz, J. Carboxymethyl benzylamide sulfonate dextrans (CMDBS), a family of biospecific polymers endowed with numerous biological properties: a review. J. Biomed. Mater. Res. **48,** 578–90 (1999).
96. Armstrong, J. K., Wenby, R. B., Meiselman, H. J. & Fisher, T. C. The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation. Biophys. J. **87,** 4259–4270 (2004).
97. de Raucourt, E., Mauray, S., Chaubet, F., Maiga-Revel, O., Jozefowicz, M. & Fischer, A. M. Anticoagulant activity of dextran derivatives. J. Biomed. Mater. Res. **41,** 49–57 (1998).
98. Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B. & Hornig, S. in Polysaccharides II **205,** 199–291 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
99. Chaubet, F., Huynh, R., Champion, J., Jozefonvicz, J. & Letourneur, D. Sulphated polysaccharides derived from dextran: Biomaterials for vascular therapy. Polym. Int. **48,** 313–319 (1999).

100. Letourneur, D., Champion, J., Slaoui, F. & Jozefonvicz, J. In vitro stimulation of human endothelial cells by derivatized dextrans. Vitr. Cell. Dev. Biol. **29A,** 67–72 (1993).
101. Osterberg, E., Bergström, K., Holmberg, K., Schuman, T. P., Riggs, J. a, Burns, N. L., Van Alstine, J. M. & Harris, J. M. Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations: comparison to PEG. J. Biomed. Mater. Res. **29,** 741–7 (1995).
102. Dubois, J., Gaudreault, C. & Vermette, P. Biofouling of dextran-derivative layers investigated by quartz crystal microbalance. Colloids Surfaces B Biointerfaces **71,** 293–299 (2009).
103. Massia, S. P., Stark, J. & Letbetter, D. S. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. Biomaterials **21,** 2253–2261 (2000).
104. Monchaux, E. & Vermette, P. Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. J. Biomed. Mater. Res. Part A **85A,** 1052–1063 (2008).
105. Zhang, R., Tang, M., Bowyer, A., Eisenthal, R. & Hubble, J. A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel. Biomaterials **26,** 4677–4683 (2005).
106. Chaubet, F., Champion, J., Maïga, O., Mauray, S. & Jozefonvicz, J. Synthesis and structure - anticoagulant property relationships of functionalized dextrans: CMDBS. Carbohydr. Polym. **28,** 145–152 (1995).
107. Löfås, S. & Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1526 (1990). doi:10.1039/c39900001526
108. Ito, T., Yeo, Y., Highley, C., Bellas, E. & Kohane, D. Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions. Biomaterials **28,** 3418–3426 (2007).
109. Zhang, R. Synthesis, characterization and reversible transport of thermo-sensitive carboxyl methyl dextran/poly (N-isopropylacrylamide) hydrogel. Polymer (Guildf). **46,** 2443–2451 (2005).
110. Kim, S.-H. & Chu, C.-C. Synthesis and characterization of dextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM. J. Biomed. Mater. Res. **49,** 517–527 (2000).
111. Dubiel, E. a., Kuehn, C., Wang, R. & Vermette, P. In vitro morphogenesis of PANC-1 cells into islet-like aggregates using RGD-covered dextran derivative surfaces. Colloids Surfaces B Biointerfaces **89,** 117–125 (2012).
112. Creixell, M., Herrera, A. P., Ayala, V., Latorre-Esteves, M., Pérez-Torres, M., Torres-Lugo, M. & Rinaldi, C. Preparation of epidermal growth factor (EGF) conjugated iron oxide nanoparticles and their internalization into colon cancer cells. J. Magn. Magn. Mater. **322,** 2244–2250 (2010).
113. Sun, Y.-X., Zhang, X.-Z., Cheng, H., Cheng, S.-X. & Zhuo, R.-X. A low-toxic and efficient gene vector: Carboxymethyl dextran-graft-polyethylenimine. J. Biomed. Mater. Res. Part A **84A,** 1102–1110 (2008).
114. Hajdukiewicz, J., Boland, S., Kavanagh, P. & Leech, D. An enzyme-amplified amperometric DNA hybridisation assay using DNA immobilised in a carboxymethylated dextran film anchored to a graphite surface. Biosens. Bioelectron. **25,** 1037–1042 (2010).
115. Uraz, I. & Güner, A. Comparison of molecular association of dextran and periodate-oxidized dextran in aqueous solutions. Carbohydr. Polym. **34,** 127–130 (1997).
116. Rebizak, R., Schaefer, M. & Dellacherie, E. Polymeric conjugates of Gd(3+)-diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. 1. Synthesis, characterization, and paramagnetic properties. Bioconjug. Chem. **8,** 605–10 (1997).
117. Herrera, A. P., Barrera, C. & Rinaldi, C. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with aminopropylsilane and carboxymethyldextran. J. Mater. Chem. **18,** 3650 (2008).
118. Hadjizadeh, a. Endothelial Cell Responses Towards Surface-modified Expanded Polytetrafluoroethylene Fibers. J. Bioact. Compat. Polym. **25,** 260–273 (2010).
119. Bär, F. W., van der Veen, F. H., Benzina, A., Habets, J. & Koole, L. H. New biocompatible polymer surface coating for stents results in a low neointimal response. J. Biomed. Mater. Res. **52,** 193–8 (2000).
120. Yuan, Y., Liu, C. & Yin, M. Plasma polymerized n-butyl methacrylate coating with potential for re-endothelialization of intravascular stent devices. J. Mater. Sci. Mater. Med. **19,** 2187–2196 (2008).
121. Curcio, A. Effect of stent coating alone on in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. AJP Hear. Circ. Physiol. **286,** 902H–908 (2003).
122. Virmani, R., Farb, A., Guagliumi, G. & Kolodgie, F. D. Drug-eluting stents: caution and concerns for long-term outcome. Coron. Artery Dis. **15,** 313–318 (2004).
123. Wang, Y.-X., Robertson, J. L., Spillman, Jr., W. B. & Claus, R. O. Effects of the Chemical Structure

and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. Pharm. Res. **21,** 1362–1373 (2004).
124. Möller, S., Weisser, J., Bischoff, S. & Schnabelrauch, M. Dextran and hyaluronan methacrylate based hydrogels as matrices for soft tissue reconstruction. Biomol. Eng. **24,** 496–504 (2007).
125. Lévesque, S. G., Lim, R. M. & Shoichet, M. S. Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications. Biomaterials **26,** 7436–7446 (2005).
126. Kadokawa, J., Saitou, S. & Shoda, S. Preparation of alginate-polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate. Carbohydr. Polym. **60,** 253–258 (2005).
127. Labarre, D., Jozefowicz, M. & Boffa, M. C. Properties of heparin-poly (methyl methacrylate) copolymers. II. J. Biomed. Mater. Res. **11,** 283–295 (1977).
128. Sui, X., Yuan, J., Zhou, M., Zhang, J., Yang, H., Yuan, W., Wei, Y. & Pan, C. Synthesis of Cellulose-graft -Poly(N , N -dimethylamino-2-ethyl methacrylate) Copolymers via Homogeneous ATRP and Their Aggregates in Aqueous Media. Biomacromolecules **9,** 2615–2620 (2008).
129. Rahman, L., Silong, S., Zin, W. M., Rahman, M. Z. A., Ahmad, M. & Haron, J. Graft copolymerization of methyl acrylate onto sago starch using ceric ammonium nitrate as an initiator. J. Appl. Polym. Sci. **76,** 516–523 (2000).
130. Elizalde-Peña, E. A., Flores-Ramirez, N., Luna-Barcenas, G., Vásquez-García, S. R., Arámbula-Villa, G., García-Gaitán, B., Rutiaga-Quiñones, J. G. & González-Hernández, J. Synthesis and characterization of chitosan-g-glycidyl methacrylate with methyl methacrylate. Eur. Polym. J. **43,** 3963–3969 (2007).
131. Zohuriaan-Mehr, M. Modified CMC: part1-optimized synthesis of carboxymethyl cellulose-g-polyacrylonitrile. Iran. Polym. J. **14,** 131–138 (2005).
132. Dupayage, L., Save, M., Dellacherie, E., Nouvel, C. & Six, J.-L. PMMA-grafted dextran glycopolymers by atom transfer radical polymerization. J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. **46,** 7606–7620 (2008).
133. Sridharan, V. & Menéndez, J. C. Cerium(IV) Ammonium Nitrate as a Catalyst in Organic Synthesis. Chem. Rev. **110,** 3805–3849 (2010).
134. Wang, L.-Q., Tu, K., Li, Y., Zhang, J., Jiang, L. & Zhang, Z. Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly(N-isopropylacrylamide). React. Funct. Polym. **53,** 19–27 (2002).
135. Campbell, D., Pethrick, R. A. & White, J. R. Polymer Characterization: Physical Techniques, 2nd Edition. (2000). at <https://books.google.com/books?hl=fr&lr=&id=qlEXUZu6cE4C&pgis=1>
136. Ryujin™ Plus - Semi-compliant PTCA balloon catheter. at <http://www.terumo-europe.com/en-emea/interventional-cardiology/coronary-intervention-products/ptca-balloon-catheter/ryujin%E2%84%A2-plus-semi-compliant-ptca-balloon-catheter>
137. Hopkins, C. G., McHugh, P. E. & McGarry, J. P. Computational Investigation of the Delamination of Polymer Coatings During Stent Deployment. Ann. Biomed. Eng. **38,** 2263–2273 (2010).
138. Boccafoschi, F., Habermehl, J., Vesentini, S. & Mantovani, D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. Biomaterials **26,** 7410–7417 (2005).
139. Marques, A. P., Reis, R. L. & Hunt, J. A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. Biomaterials **23,** 1471–1478 (2002).
140. Punshon, G., Vara, D., Sales, K., Kidane, a, Salacinski, H. & Seifalian, a. Interactions between endothelial cells and a poly(carbonate-silsesquioxane-bridge-urea)urethane. Biomaterials **26,** 6271–6279 (2005).
141. Derkaoui, S. M., Avramoglou, T., Barbaud, C. & Letourneur, D. Synthesis and Characterization of a New Polysaccharide- graft -polymethacrylate Copolymer for Three-Dimensional Hybrid Hydrogels. Biomacromolecules **9,** 3033–3038 (2008).
142. Derkaoui, S. M., Labbé, A., Purnama, A., Gueguen, V., Barbaud, C., Avramoglou, T. & Letourneur, D. Films of dextran-graft-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. Acta Biomater. **6,** 3506–3513 (2010).
143. Lewis, F. & Mantovani, D. Methods to Investigate the Adhesion of Soft Nano-Coatings on Metal Substrates - Application to Polymer-Coated Stents. Macromol. Mater. Eng. **294,** 11–19 (2009).
144. Lewis, F., Turgeon, S., Chevallier, P., Pireaux, J.-J., Tatoulian, M. & Mantovani, D. On the Growth of Fluorocarbon Thin Films Deposited on Plasma-Etched 316L Stainless Steel. Plasma Process. Polym. **7,** 309–317 (2010).

145. Bickel, C., Rupprecht, H. J., Darius, H., Binz, C., Hauröder, B., Krummenauer, F. & Meyer, J. Substantial reduction of platelet adhesion by heparin-coated stents. J. Interv. Cardiol. **14,** 407–13 (2001).
146. Nelson, S. R., deSouza, N. M. & Allison, D. J. Endovascular Stents and Stent-Grafts: Is Heparin Coating Desirable? Cardiovasc. Intervent. Radiol. **23,** 252–255 (2000).
147. Verheye, S., Markou, C. P., Salame, M. Y., Wan, B., King, S. B., Robinson, K. a, Chronos, N. a & Hanson, S. R. Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **20,** 1168–1172 (2000).
148. Hadjizadeh, A. & Doillon, C. J. Directional migration of endothelial cells towards angiogenesis using polymer fibres in a 3D co-culture system. J. Tissue Eng. Regen. Med. **4,** 524–531 (2010).
149. McArthur, S. L., McLean, K. M., Kingshott, P., St John, H. a. W., Chatelier, R. C. & Griesser, H. J. Effect of polysaccharide structure on protein adsorption. Colloids Surfaces B Biointerfaces **17,** 37–48 (2000).
150. Liberelle, B., Merzouki, A. & Crescenzo, G. De. Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA. J. Immunol. Methods **389,** 38–44 (2013).
151. Dubiel, E. a. & Vermette, P. Solution composition impacts fibronectin immobilization on carboxymethyl-dextran surfaces and INS-1 insulin secretion. Colloids Surfaces B Biointerfaces **95,** 266–273 (2012).
152. Capitani, D., Porro, F. & Segre, a L. High field NMR analysis of the degree of substitution in carboxymethyl cellulose sodium salt. Carbohydr. Polym. **42,** 283–286 (2000).
153. Sarra-Bournet, C., Turgeon, S., Mantovani, D. & Laroche, G. A study of atmospheric pressure plasma discharges for surface functionalization of PTFE used in biomedical applications. J. Phys. D. Appl. Phys. **39,** 3461–3469 (2006).
154. Williams, A. & Ibrahim, I. T. Carbodiimide chemistry: recent advances. Chem. Rev. **81,** 589–636 (1981).
155. Sarra-Bournet, C., Ayotte, G., Turgeon, S., Massines, F. & Laroche, G. Effects of Chemical Composition and the Addition of H_2 in a N_2 Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge on Polymer Surface Functionalization. Langmuir **25,** 9432–9440 (2009).
156. Chatelier, R. C., Drummond, C. J., Chan, D. Y. C., Vasic, Z. R., Gengenbach, T. R. & Griesser, H. J. Theory of Contact Angles and the Free Energy of Formation of Ionizable Surfaces: Application to Heptylamine Radio-Frequency Plasma-Deposited Films. Langmuir **11,** 4122–4128 (1995).
157. Hartley, P. G., McArthur, S. L., McLean, K. M. & Griesser, H. J. Physicochemical properties of polysaccharide coatings based on grafted multilayer assemblies. Langmuir **18,** 2483–2494 (2002).
158. McArthur, S. L., Wagner, M. S., Hartley, P. G., McLean, K. M., Griesser, H. J. & Castner, D. G. Characterization of sequentially grafted polysaccharide coatings using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and principal component analysis (PCA). Surf. Interface Anal. **33,** 924–931 (2002).
159. Tasker, S., Matthijs, G., Davies, M. C., Roberts, C. J., Schacht, E. H. & Tendler, S. J. B. Molecular Resolution Imaging of Dextran Monolayers Immobilized on Silica by Atomic Force Microscopy. Langmuir **12,** 6436–6442 (1996).
160. Piehler, J., Brecht, A., Hehl, K. & Gauglitz, G. Protein interactions in covalently attached dextran layers. Colloids Surfaces B Biointerfaces **13,** 325–336 (1999).
161. Heath, M. F., Evans, R. J. & Hayes, L. J. Dextran-70 inhibits equine platelet aggregation induced by PAF but not by other agonists. Equine Vet. J. **30,** 408–411 (1998).
162. Österberg, E., Bergström, K., Holmberg, K., Riggs, J. a., Van Alstine, J. M., Schuman, T. P., Burns, N. L. & Harris, J. M. Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. **77,** 159–169 (1993).
163. Thalla, P. K., Fadlallah, H., Liberelle, B., Lequoy, P., De Crescenzo, G., Merhi, Y. & Lerouge, S. Chondroitin Sulfate Coatings Display Low Platelet but High Endothelial Cell Adhesive Properties Favorable for Vascular Implants. Biomacromolecules **15,** 2512–2520 (2014).
164. Hubbell, J. A. Biomaterials in tissue engineering. Bio/Technology **13,** 565–576 (1995).
165. Peng, T., Gibula, P., Yao, K. De & Goosen, M. F. a. Role of polymers in improving the results of stenting in coronary arteries. Biomaterials **17,** 685–694 (1996).
166. Bachleda, P., Utikal, P., Kalinova, L., Kocher, M., Cerna, M., Kolar, M. & Zadrazil, J. Infectious complications of arteriovenous eptfe grafts for hemodialysis. Biomed. Pap. **154,** 13–19 (2010).

167. Ronco, C. Is the peritoneal catheter a barrier for a wider utilization of PD? Let's go ahead with research and development! Int. J. Artif. Organs **29,** 1 (2006).
168. Chen, S., Li, L., Zhao, C. & Zheng, J. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. Polymer (Guildf). **51,** 5283–5293 (2010).
169. Vladkova, T. G. Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties. Int. J. Polym. Sci. **2010,** 1–22 (2010).
170. Deshmukh, S. R. & Singh, R. P. Drag reduction effectiveness, shear stability and biodegradation resistance of guargum-based graft copolymers. J. Appl. Polym. Sci. **33,** 1963–1975 (1987).
171. Biswal, D. R. & Singh, R. P. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. Carbohydr. Polym. **57,** 379–387 (2004).
172. Okieimen, F. E. & Ogbeifun, D. E. Graft copolymerizations of modified cellulose, grafting of acrylonitrile, and methyl methacrylate on carboxy methyl cellulose. J. Appl. Polym. Sci. **59,** 981–986 (1996).
173. Pourjavadi, A., Mahdavinia, G. R., Zohuriaan-Mehr, M. J. & Omidian, H. Modified chitosan. I. Optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-graft-polyacrylonitrile. J. Appl. Polym. Sci. **88,** 2048–2054 (2003).
174. Castellano, I., Gurruchaga, M. & Goñi, I. The influence of drying method on the physical properties of some graft copolymers for drug delivery systems. Carbohydr. Polym. **34,** 83–89 (1997).
175. Chan, C.-K. & Chu, I.-M. Phase behavior and molecular chain environment of organic–inorganic hybrid materials based on poly(n-butyl methacrylate-co-(3-(methacryloxypropyl)) trimethoxysilane). Polymer (Guildf). **42,** 6823–6831 (2001).
176. Derkaoui, S. M., Labbé, A., Chevallier, P., Holvoet, S., Roques, C., Avramoglou, T., Mantovani, D. & Letourneur, D. A new dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on 316L metallic stents enhances endothelial cell coverage. Acta Biomater. **8,** 3509–15 (2012).
177. Michel, E. C., Montaño-Machado, V., Chevallier, P., Labbé-Barrère, A., Letourneur, D. & Mantovani, D. Dextran grafting on PTFE surface for cardiovascular applications. Biomatter **4,** e28805 (2014).
178. Okieimen, F. E. & Ogbeifun, D. E. Graft copolymerizations of modified cellulose: Grafting of methyl acrylate, ethyl acrylate and ethyl methacrylate on carboxy methyl cellulose. Eur. Polym. J. **32,** 311–315 (1996).
179. Chauvierre, C., Labarre, D., Couvreur, P. & Vauthier, C. Radical Emulsion Polymerization of Alkylcyanoacrylates Initiated by the Redox System Dextran−Cerium(IV) under Acidic Aqueous Conditions. Macromolecules **36,** 6018–6027 (2003).
180. Gao, J.-P., Tian, R.-C., Yu, J.-G. & Duan, M.-L. Graft copolymers of methy methacrylate onto canna starch using manganic pyrophosphate as an initiator. J. Appl. Polym. Sci. **53,** 1091–1102 (1994).
181. Lin, O. H., Kumar, R. N., Rozman, H. D. & Mohd. Noor, M. A. Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators. Carbohydr. Polym. **59,** 57–69 (2005).
182. Yang, F., Li, G., He, Y.-G., Ren, F.-X. & Wang, G. Synthesis, characterization, and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. Carbohydr. Polym. **78,** 95–99 (2009).
183. Ukai, S., Yoshida, I., Honda, A., Nagai, K. & Kiho, T. The distribution of carboxymethyl groups in O-(carboxymethyl)ated (1 → 3)-β-d-glucans and (1 → 3)-α-d-glucans. Carbohydr. Res. **224,** 201–208 (1992).
184. Ceresa, R. J. The synthesis of block and graft copolymers of cellulose and its derivatives. Polymer (Guildf). **2,** 213–219 (1961).
185. Gaylord, N. A proposed new mechanism for catalyzed and uncatalyzed graft polymerization onto cellulose. J. Polym. Sci. Part C Polym. Symp. **37,** 153–172 (1972).
186. Gaylord, N. G. & Anand, L. C. Cellulose graft copolymers. II. Grafting of methacrylonitrile in the presence of ceric ion or ammonium persulfate. J. Polym. Sci. Part B Polym. Lett. **10,** 285–294 (1972).
187. Gaylord, N. G. Cellulose-Monomer Interaction and a Revised Mechanism for Graft Copolymerization. J. Macromol. Sci. Part A - Chem. **10,** 737–757 (1976).
188. Jenkins, D. W. & Hudson, S. M. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers. Chem. Rev. **101,** 3245–3273 (2001).
189. Cerrada, M. L. in Therm. Anal. Fundam. Appl. to Mater. Charact. 167–182 (Universidade da Coruña,

2005). at <http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/11487>
190. Watanabe, H. Viscoelasticity and dynamics of entangled polymers. Prog. Polym. Sci. **24,** 1253–1403 (1999).
191. Tranchida, D., Piccarolo, S. & Soliman, M. Nanoscale Mechanical Characterization of Polymers by AFM Nanoindentations: Critical Approach to the Elastic Characterization. Macromolecules **39,** 4547–4556 (2006).
192. Lentz, C. W. Method of making silicone rubber fillers. (1964). at <https://www.google.com/patents/US3122520>
193. Swanson, J. W. & Lebeau, J. E. The effect of implantation on the physical properties of silicone rubber. J. Biomed. Mater. Res. **8,** 357–67 (1974).
194. Binnemans, K. in Handb. Phys. Chem. Rare Earths **36,** 281–392 (2006).
195. Berlin, A. A. & Kislenko, V. N. Kinetics and mechanism of radical graft polymerization of monomers onto polysaccharides. Prog. Polym. Sci. **17,** 765–825 (1992).
196. Karunaratne, V., Hoveyda, H. R. & Orvig, C. General method for the synthesis of trishydroxamic acids. Tetrahedron Lett. **33,** 1827–1830 (1992).
197. Wong, K. K. W., Cölfen, H., Whilton, N. T., Douglas, T. & Mann, S. Synthesis and characterization of hydrophobic ferritin proteins. J. Inorg. Biochem. **76,** 187–195 (1999).
198. Valeur, E. & Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. Chem. Soc. Rev. **38,** 606–631 (2009).
199. Mikołajczyk, M. & Kiezłbasiński, P. Recent developments in the carbodiimide chemistry. Tetrahedron **37,** 233–284 (1981).