

I.Kacem^{1,2,3*}, E. Jean Baptiste⁴, M. Jimenez^{2*}, N. Blanchemain^{4*}, F. Chai⁴, B. Martel¹, S. Roudesli³, H.F. Hildebrand⁴, M. Traisnel²

1 Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire CNRS UMR 8009 - Université Lille Nord De France, F-59655 Villeneuve D'Ascq (France)

2 Laboratoire des Procédés d'Elaboration de Revêtements Fonctionnels, LSPEs, CNRS UMR 8008, ENSCL - Université Lille Nord De France, 59652 Villeneuve D'Ascq (France)

3 Laboratoire des Polymères Bio-polymères Matériaux organiques - Université de Monastir, Avenue de l'Environnement 5019 Monastir (Tunisie)

4 Groupe de Recherche sur les Biomatériaux EA 1049, Faculté de Médecine - Université Lille Nord De France, F-59045 Lille (France)

**imen.kacem@ed.univ-lille1.fr; *mjimenez@enscl.fr, *nblanchemain@univ-lille2.fr*

Sections de rattachement : 33

Secteur : Secondaire

RÉSUMÉ. Le but de ce travail a été de modifier un non tissé en polyester (PET) par l'acide acrylique (AA) en vue d'immobiliser des molécules bio-actives sur ce support destiné à être utilisé en tant qu'implant vasculaire. Cette étude décrit le procédé de copolymérisation greffante de l'AA sur le PET activé par traitement plasma froid, la caractérisation, et l'effet de cette modification de surface sur la réponse biologique in-vitro des cellules et du sang. Différents paramètres interviennent dans le processus de greffage de l'AA sur le PET, les conditions expérimentales optimales consistent à activer le PET par un traitement Plasma Froid Ar/O₂ de 120 secondes puis de greffer l'AA pendant 4 heures à 80°C sous N₂. La densité de fonctions carboxyliques greffées sur le polyester est déterminée grâce à un dosage spectrophotométrique au Bleu de Toluidine Oxydé (TBO). Différents échantillons, de densité croissante en fonctions carboxyliques ont été préparés et leur surface a été caractérisée par goniométrie, AFM et MEB. L'évaluation biologique a montré une diminution de la prolifération des cellules endothéliales (CE) et des cellules musculaires lisses (CML) respectivement de 10% et 60%. Le test de l'hémocompatibilité a également montré une diminution de l'adhésion plaquettaire (30%). En conséquence, le greffage d'AA amène une sélectivité dans la prolifération des cellules ainsi qu'une diminution de l'adhésion plaquettaire. Ainsi ces deux qualités très bénéfiques pour un biomatériau à usage vasculaire ont été obtenues sans qu'il soit nécessaire de greffer une molécule bioactive spécifique.

MOTS-CLÉS : polyester, acide acrylique, plasma froid, copolymérisation greffante, biocompatibilité, hémocompatibilité

1. Introduction

La compétition entre la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) et des cellules endothéliales (CE) sur les prothèses vasculaires ou les stents est cruciale pour la prévention de la restenose : la trop forte prolifération des CML peut provoquer une restenose et/ou une thrombose. De nombreuses recherches ont été effectuées afin de diminuer la prolifération des CML en utilisant des molécules spécifiques (sirolimus, paclitaxel) enduites sur des stents métalliques [1,2]. De très bons résultats ont été obtenus quant à la diminution de la restenose : 10% de restenose avec un stent enduit de sirolimus contre 26% avec un stent classique [3]. Ces stents enduits d'agents antiprolifératifs ont certains inconvénients : L'endothélialisation des implants est limitée : 3,3% de revascularisation contre 19,8% avec un stent classique [4]. De plus, le phénomène de thrombose est plus fréquent avec l'utilisation d'un stent enduit [5]. D'autres investigations ont été menées pour fixer des molécules comme l'héparine, l'insuline, le collagène ou des peptides sur la surface des prothèses vasculaires en polyester contenant des fonctions carboxyliques apportées par un traitement plasma froid puis un greffage d'acide acrylique. Le traitement plasma froid permet notamment la création de groupements hydroperoxydes en surface du polyester [6] : leur décomposition thermique en radicaux libres permet le greffage d'acide acrylique par polymérisation radicalaire [7]. Baquey *et al.* [8] ont montré la possibilité de fixer un peptide Arginine-Glycine-Aspartique (RGD) sur les groupements carboxyliques par l'intermédiaire d'un bras espaceur (PEG) pour augmenter l'adhésion des cellules endothéliales sur le support. Gupta *et al.* [9] ont fixé du collagène sur le polyester dans le but d'améliorer l'attache des cellules musculaires lisses et Kim *et al.* [10] ont montré une diminution de l'adhésion plaquettaire après immobilisation d'insuline et d'héparine sur les supports greffés avec l'acide acrylique (AA). L'objectif de cette étude est de greffer une « ancre » de nature acrylique sur la surface des implants (polyester et PTFE expansé) afin d'immobiliser des molécules bio-actives sélectives vis-à-vis des cellules (statines) ou des molécules cages (cyclodextrines) pour la libération prolongée de médicament. Ce papier décrit l'optimisation des paramètres de greffage de l'AA sur le polyester (PET), les caractérisations de surface et l'évaluation biologique des supports greffés.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons en polyester non tissé (PRIDESA, Tratamiento de Aguas y Residuos, Centra del Medio, España) sont coupés sous forme de pastilles de 15 mm de diamètre, lavés 3 heures au soxhlet à l'éthanol et 3 heures au soxhlet à l'eau distillée.

2.2. La modification de surface

Les échantillons de polyester sont activés par traitement plasma froid (Europlasma apparatus CD1200-400 COMBI MC, générateur Radio Fréquence (Dressler) – 13,56 MHz) avec un mélange Argon/Oxygène (85%/15%). Les échantillons sont traités pendant 120 secondes (130 mTorr, 300 watts), exposés à un air pur et sec pendant 35 secondes puis finalement exposés à l'air avec contrôle de l'humidité pendant 45 minutes. Les échantillons activés sont immergés dans une solution aqueuse d'AA (Acros Organic) à différentes concentrations comprises entre 0.5 et 5 M. La réaction de greffage est effectuée pour des températures de 40 à 80°C pendant 1 à 6 heures. Les échantillons greffés par l'AA sont finalement lavés pendant 1 heure dans un bain d'eau aux ultrasons et lavés au soxhlet à l'eau distillée pendant 6 heures dans le but d'éliminer toute trace d'homopolymère d'AA.

2.3. Caractérisations de surface

2.3.1. Dosage TBO

La densité de fonctions carboxyliques (nmol de COOH par centimètre carré de support) est déterminée par dosage spectrophotométrique à l'aide du bleu de toluidine oxydé (TBO). Les échantillons de polyester greffés par l'AA sont placés à 30°C pendant 4 h dans des pots contenant 20 mL d'une solution à 0,5 mM de TBO (pH 10). Les échantillons sont rincés dans une solution de NaOH (pH 10) afin d'enlever le TBO non complexé. Ils sont ensuite plongés dans 20 mL d'une solution d'acide acétique à 50% (v/v) pendant 20 minutes à l'abri de la lumière afin de désorber le TBO complexé. Le nombre de fonctions carboxyliques est déterminé par dosage spectrophotométrique de la solution à 634 nm.

2.3.2. MEB

La surface des échantillons de polyester greffés par l'AA a été observée à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage (JEOL JSM 5300) à une vitesse de voltage de 25 kV et à un courant de 100 mA.

2.3.3. La mouillabilité

La détermination du caractère hydrophile des échantillons de polyester greffés par l'AA a été réalisée par la méthode de mesure de l'angle de contact (DIGIDROP GBX). Une goutte d'eau de 5 µl est déposée sur la surface des échantillons, l'image de la goutte est capturée par une caméra vidéo et l'angle de contact est mesuré. La procédure de mesure est répétée 10 fois par échantillons et la température est fixée à 25°C.

2.4. Evaluation biologique *in vitro*

2.4.1. La culture des cellules

Les tests biologiques *in vitro* ont été effectués avec des cellules endothéliales de type Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC, PromoCell®) et des cellules musculaires lisses de type Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells (HPASMC, PromoCell®) dans le respect des normes Internationales et Européennes (ISO 10993-5/EN 30993-5). Les cellules sont cultivées avec leurs propres milieux de culture contenant de la fungizone (25 µg/mL, Gibco BRL) et de la gentamicine (50 µg/mL, Panpharma) dans un incubateur (CB 150/APT line/Binder) à 37°C avec une atmosphère contenant 5% CO₂ et 100% d'humidité relative.

2.4.2. Test de la prolifération cellulaire

Les échantillons, stérilisés par rayonnement gamma (2,5 Mrad), sont placés dans des boîtes de culture de 24 puits (Costar®, Starlab). 7×10^3 cellules sontensemencées dans chaque puit contenant les échantillons. La prolifération cellulaire est mesurée à l'aide d'un réactif fluorescent non toxique : le bleu Alamar (alamarBlue® dye, Interchim). 3 et 6 jours après l'incubation, le milieu de culture est retiré de chaque puits et remplacé par 500 µl de Bleu Alamar dilué à 10% dans le milieu de culture. Après 3 heures d'incubation, les solutions sont transférées dans des plaques de 96 puits à fond noir (Nunc, Polylabo) et leur fluorescence est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Twinkle LB970™, Berthold) à 590 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au polyester vierge ± écart type.

2.4.3. Test d'adhésion plaquettaire

Les échantillons sont placés dans des boîtes de culture de 24 puits (Costar®, Starlab). 5.1×10^3 plaquettes en suspension dans une solution tampon à pH 7.4 (PSB) sont ensuite ajoutées dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les puits sont vidés et rincés 6 fois avec une solution de PBS, 100 µL de PSB et 100 µL de solution 1.5% Triton-PBS sont ensuite ajoutés pour lyser les plaquettes adhérentes sur les échantillons. Après 1 heure d'incubation à 37°C, le kit colorimétrique de la LDH est ajouté (100 µL) pendant 20 minutes à 37°C et la réaction est stoppée après l'ajout de 50 µL of HCl (1 N). Finalement, 175 µL de la solution est transférée dans une plaque à 96 puits et la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 490 nm. Les résultats sont exprimés par le nombre de plaquettes adhérentes sur la surface des échantillons.

3. Résultats

3.1. Optimisation du traitement plasma froid

Les échantillons en PET non tissé sont activés par traitement plasma froid en présence d'oxygène pour créer des groupements hydroperxydes, peroxydes et hydroxydes. Le teste d'angle de contact montre que ces groupements augmentent le caractère hydrophile du PET. La figure 1 présente l'évolution de l'angle de contact de l'eau sur les PET activés en fonction du temps de traitement plasma froid. Une diminution remarquable de l'angle de contact (de 110° à 20° après 15 secondes de traitement) a été observée. Ce qui montre qu'une densité limite de groupements créés à la surface du polyester est atteinte pour une hydrophilie maximale après un court traitement plasma. En se basant sur ces résultats, un traitement plasma de 120 secondes avec une exposition à l'air avec contrôle de l'humidité pendant 45 minutes seront appliqués avant le greffage d'AA. Le temps de 45 minutes est considéré comme nécessaire pour la stabilité des fonctions peroxydes créés. L'étude de Lu et al. montre que ces groupements restent stable de 25 à 60 minutes après le traitement plasma froid [6].

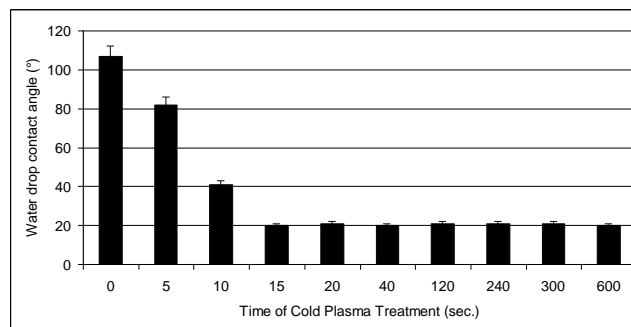


Figure 1 : Evolution de l'angle de contact de l'eau à la surface de PET non tissé en fonction du temps de traitement plasma froid (Ar/O₂ - 85%/15%, 300 watts)

3.2. Optimisation du greffage de l'acide acrylique

L'acide acrylique (2,5 M) a été greffé sur le polyester préalablement activé par un traitement plasma froid (Ar/O₂, 120 secondes) à différentes températures (40 - 60°C) et temps de réaction (1 - 6 heures). La figure 2 montre l'influence du temps et de la température de greffage de l'AA sur la densité de fonctions COOH greffées. Pour une température de 40°C, la quantité de fonctions carboxyliques greffées sur le polyester n'excède pas 34 nmoles/cm² même après 6 heures de réaction. A haute température

(60°C et 80°C), une équivalence est observée entre le temps et la température de greffage de l'AA sur le polyester activé : La quantité de fonctions COOH atteint un plateau (280 – 290 nmoles/cm²) après 4 heures de réaction à 60°C et seulement une heure à 80°C. Un greffage des échantillons à 80°C pendant 4 heures sera le protocole appliqué pour la suite de l'étude.

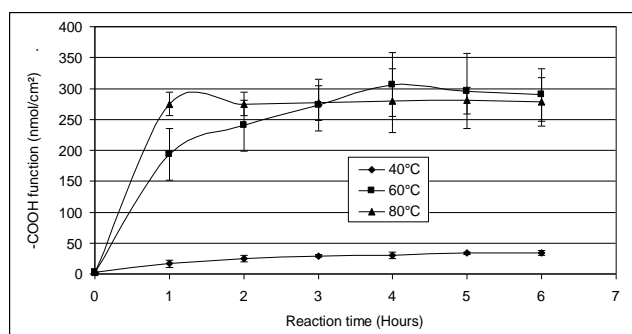


Figure 2 . Influence du temps et de la température de greffage de l'AA (2,5M) sur le polyester activé par plasma froid (Ar/O₂ - 85%/15%, 120 sec, 300 watts)

La figure 3 montre l'influence de la concentration d'AA sur la densité de fonctions carboxyliques dosées en surface du polyester activé. Plus la concentration d'AA est grande et plus la densité de fonctions COOH greffées sur le polyester activé augmente. Pour une concentration en AA de 5M, un maximum de fonctions carboxyliques a été atteint mais la formation d'un gel d'homopolymère d'AA dans le bain réactionnel révèle une copolymérisation non contrôlée de l'AA sur le polyester. La concentration de 2,5M en AA sera donc conservée pour l'évaluation biologique.

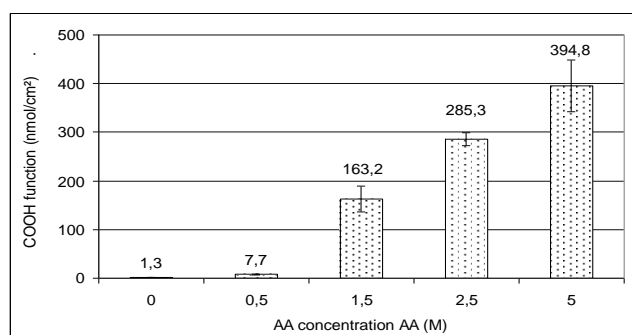


Figure 3 . Influence de la concentration de l'AA sur le greffage d'AA (80°C, 4 heures) sur le polyester activé par plasma froid (Ar/O₂ - 85%/15%, 120 sec, 300 watts)

Les clichés réalisés par MEB et AFM présentés en figures 4a et 4b montrent une surface très lisse des fibres de polyester non tissé vierge. En revanche, les figures 5a et 5b montrent que le greffage d'AA sur le polyester forme une gaine de polymère de PAA continue sur la fibre qui rend la surface de la fibre légèrement plus rugueuse.

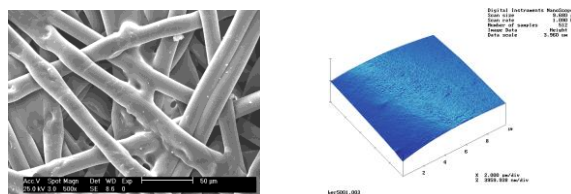


Figure 4 . Images MEB et AFM du polyester vierge

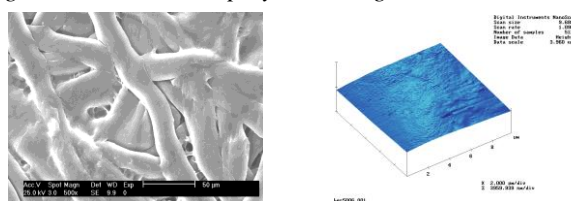


Figure 5. Images MEB et AFM du polyester greffé avec l'AA (2,5M).

3.3. Evaluation biologique

L'évaluation biologique du polyester vierge et greffé avec l'AA (2,5M) a été réalisé avec les cellules endothéliales de type Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) et musculaires lisses de type Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells (HPASMC). Le greffage d'AA sur le polyester induit une diminution de la prolifération des deux types de cellules (Figure 6). En fait, la prolifération des HPASMC est plus affectée que celle des HUVEC. Après 3 jours d'incubation, la prolifération des HUVEC sur le polyester greffé diminue de 20% comparé au polyester alors que la prolifération des HPASMC diminue de 43%. Après 6 jours d'incubation, la prolifération des HUVEC sur le polyester greffé diminue de 16% comparé au polyester alors que la prolifération des HUVEC diminue de 65%. La prolifération des SMC est donc plus affectée que la prolifération des EC, ceci révèle une sélectivité du support greffé vis-à-vis des cellules.

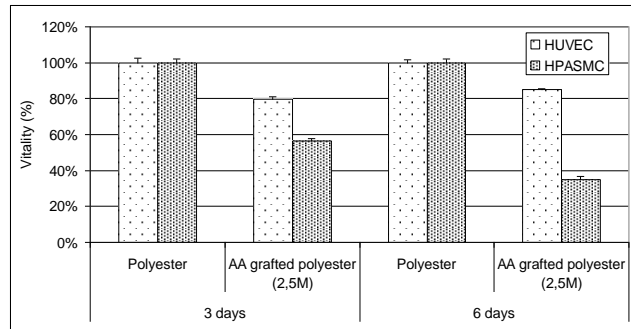


Figure 6 . Prolifération des cellules endothéliales (HUVEC) et musculaires lisses (HPASMC) sur le polyester vierge et greffé avec l'AA.

Le test de l'adhésion plaquettaire a été réalisé sur le polyester vierge et greffé avec l'AA (2,5M). la figure 7 montre une diminution significative de l'adhésion des plaquettes sur le polyester greffé avec l'AA. Le greffage d'AA sur le polyester provoque une diminution notable de 28% de l'adhésion des plaquettes comparé au polyester.

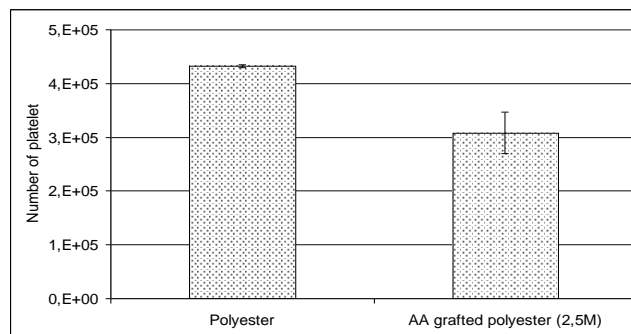


Figure 7 . Adhésion des plaquettes sur le polyester vierge et greffé avec l'AA.

4. Conclusion

L'étude du greffage de l'acide acrylique sur le polyester pré-activé par plasma froid a montré qu'une concentration de 2,5M en AA permettait d'obtenir un greffage homogène autour des fibres. A cette concentration, une diminution significative de l'adhésion des plaquettes a été observée ainsi qu'un effet sélectif vis-à-vis des cellules : Les cellules musculaires lisses sont plus affectées que les cellules endothéliales. Le simple greffage de fonctions carboxyliques sur le polyester permet d'obtenir des

propriétés intéressantes dans la lutte contre la restenose et la thrombose. Ainsi deux qualités bénéfiques pour un biomatériau à usage vasculaire ont été obtenues (diminution de la prolifération des CML et de l'adhésion plaquettaire) sans qu'il soit nécessaire de greffer une molécule bioactive spécifique. Toutefois, seule une étude *in vivo* pourra confirmer les tendances observées *in vitro*.

Bibliographie

- [1] Wessely R, Schömig A, Kastrati A. *Sirolimus and Paclitaxel on polymer-based drug eluting stents*. J Am Coll Cardiol 2006;7:708-714
- [2] Lee SS, Price MJ, Wong GB, Valencia R, Damani S, Sawhney N, Gollapudi RR, Schatz RA, Teirstein PS. *Early- and medium-term outcomes after Paclitaxel-eluting stent implantation for Sirolimus-eluting stent failure*. Am J Cardiol 2006;98:1345-1348
- [3] Suh J-W, Park J-S, Cho H-J, Kim M-S, Kang H-J, Cho Y-S, Koo B-K, Chung W-Y, Youn T-J, Chae I-N, Choi D-J, Kim H-S, Ohn D-W, Oh B-H, Park Y-B. *Sirolimus-eluting stent showed better one-year outcomes than paclitaxel-eluting stent in a real life setting of coronary intervention in Koreans*. Int J Cardiol 2007;117:31-36
- [4] Carrié D. *Maladie Coronaire : La course des stents et des marqueurs*. XV^{es} Journées européennes de la SFC 2005;138:24-28
- [5] McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, Suddath WO, Weissman NJ, Torguson R, Hent KM. *Late thrombosis rug eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy*. Lancet 2004;364:1519-1521.
- [6] Lu WL, Huang CY, Roan ML. *Effect of plasma treatment on the degree of Aam grafting for High-density polyethylene*. Surf Coat Technol 2003;172:251-261.
- [7] Shin Y, Son K, Il Yoo D – *Functional finishing by using atmospheric pressure plasma: grafting of PET nonwoven fabric*. J Appl Polym Sci 2007;103:3655-3659
- [8] Baquey Ch, Palumbo F, Porte-Durrieu MC, Legeay G, Tressaud A, D'Agostino R. *Plasma Treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalisation of its surface*. Nucl Instrum Methods Phys Res 1999;B151:255-262
- [9] Gupta B, Plummer C, Bisson I, Frey P, Hilborn J. *Plasma-induced graft polymerisation of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films : characterisation and human smooth muscle cell growth on grafted films*. Biomaterials 2002;23:863-871
- [10] Kim YJ, Kang IK, Huh MW, Yoon SG. *Surface characterisation and in vitro compatibility of poly(ethylene terephthalate) immobilized with insulin and/or heparin using plasma glow discharge*. Biomaterials 2000;21:121-130