



Titre: Polymères et traitements endovasculaires des anévrismes
Title:

Auteur: Annick Metcalfe
Author:

Date: 2003

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Metcalfe, A. (2003). Polymères et traitements endovasculaires des anévrismes
Citation: [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/7290/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7290/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'Hocine Yahia, & Jean Raymond
Advisors:

Programme: Unspecified
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

POLYMÈRES ET TRAITEMENTS ENDOVASCULAIRES DES ANÉVRISMES

ANNICK METCALFE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
DÉCEMBRE 2003

© Annick Metcalfe, 2003.



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

ISBN: 0-612-90848-8

Our file *Notre référence*

ISBN: 0-612-90848-8

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

POLYMÈRES ET TRAITEMENTS ENDOVASCULAIRES DES ANÉVRISMES

présenté par : METCALFE Annick

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

A été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. CARTILIER Louis, PhD, président,

M. YAHIA L'Hocine, PhD, membre et directeur de recherche,

M. RAYMOND Jean, MD, membre et codirecteur de recherche,

M. SOULEZ Gilles, MD, membre externe.

DÉDICACE

À mes parents Louise et Michel.

À mon frère Francis.

À François.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Yahia, qui m'a permis de faire partie de son groupe de recherche et, ainsi, d'entrer dans le merveilleux monde des biomatériaux.

Mes sincères remerciements au Dr Jean Raymond, qui m'a fourni l'aide et les outils nécessaires pour entreprendre mes recherches.

Je voudrais aussi remercier le Dr Sokolowski, qui m'a fourni la matière première principale pour mes recherches.

Merci au Dr Anne-Cécile Desfaits, qui a su guider mes premiers pas au sein du Laboratoire de Neuroradiologie Interventionnelle (NRI, Centre de recherche de l'Hôpital Notre-Dame).

Merci à Igor Salazkin, chirurgien du NRI, pour son aide précieuse au cours des expériences animales.

Merci à Guylaine Gévry pour son aide sur divers plans.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Caroline Blais, Isabelle Houle, Dr Hélène Héon, vétérinaire, ainsi que tout le personnel de l'animalerie pour leur support et leur aide constante.

Merci au Dr Louis Cartilier et Dr Gilles Soulez d'avoir accepté de faire partie de mon jury, ainsi que pour leurs corrections et commentaires pertinents.

Je tiens à remercier Dr Daniel Roy, Dr Olivier Robledo et Vickie Lebel pour leurs commentaires et suggestions.

Merci à Diane Giroux et Louise Clément pour leur aide précieuse, leur gentillesse et leur dévouement. Je voudrais également remercier Brigitte Dubreuil pour son aide et son éternel sourire.

Je voudrais aussi remercier Sylvie Paiement, bibliothécaire, qui m'a gentiment fourni les nombreux articles nécessaires à mes recherches.

Finalement, merci aux étudiants de Génie biomédical que j'ai connus, ainsi que ceux que je n'ai pas connus, pour votre soutien et source d'inspiration.

RÉSUMÉ

Les anévrismes intracrâniens et les anévrismes de l'aorte abdominale sont deux pathologies répandues et potentiellement mortelles. Des méthodes de traitement minimalement invasives ont été développées comme alternative au traitement chirurgical classique, afin de diminuer les séquelles post-opératoires et le temps d'hospitalisation.

Le CHEM ou « Cold Hibernated Elastic Memory » est un polyuréthane à mémoire de forme qui pourrait être utile au traitement endovasculaire des anévrismes. Le CHEM peut-être miniaturisé et acheminé via des cathéters, jusqu'au site de traitement, où il prend de l'expansion et retrouve sa forme initiale sous l'effet de la température, ce qui permet l'occlusion de l'anévrisme.

La biocompatibilité du CHEM a été démontrée par des tests *in vitro*. Des anévrismes expérimentaux canins ont pu être occlus à l'aide du CHEM introduit par voie chirurgicale. L'embolisation transcathéter *in vivo* des artères maxillaires a également été possible à l'aide du CHEM. L'évolution angiographique, ainsi que la réaction tissulaire au CHEM ont été étudiées à 3 semaines et 3 mois.

L'utilité de deux autres polymères a également été explorée. L'alginate a été testé pour l'occlusion d'anévrismes par voie chirurgicale et endovasculaire, ainsi que pour le transport *in situ* de facteurs de croissance. Le poloxamère, un gel thermoréversible a été évalué pour réaliser une occlusion artérielle temporaire et réversible par voie endovasculaire.

Certaines caractéristiques favorables du CHEM telles : sa mémoire de forme, sa porosité, sa faible thrombogénicité et la faible réaction inflammatoire qu'il engendre en font un agent embolisant prometteur. En effet, les résultats obtenus à l'aide du CHEM

ont montré son utilité potentielle dans l'occlusion des artères de moyen et gros calibre. L'embolisation des anévrismes n'a pas conduit à des récurrences significatives à 3 mois. Il serait donc nécessaire de travailler la miniaturisation et les techniques de transport transcathéter du CHEM afin de rencontrer les exigences cliniques du traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens. L'utilisation du CHEM comme agent occlusif, complémentaire aux « stent-grafts » dans le traitement des anévrismes aortiques, est une application réaliste; mais elle devra faire l'objet d'une analyse plus poussée.

Ces polymères (CHEM, alginate et poloxamère) sont des matériaux prometteurs dans l'élaboration d'une stratégie « bioactive » susceptible d'améliorer les résultats du traitement endovasculaire des anévrismes.

ABSTRACT

Intracranial and abdominal aortic aneurysms are frequent and potentially life threatening conditions. Minimally invasive techniques have been developed as alternatives to surgery, to reduce treatment-related morbidity and to fasten recovery.

CHEM is a shape memory polyurethane with appealing properties for the endovascular treatment of aneurysms. It's shape memory permits miniaturisation and transcatheter delivery to reach the treatment site, where it expands with temperature to occlude the aneurysmal sac.

CHEM biocompatibility has been demonstrated *in vitro*. Canine experimental aneurysms were occluded per-operatively with CHEM blocks. Canine internal maxillary arteries were also occluded with CHEM using a transcatheter technique. The angiographic evolution and tissue reaction to CHEM have been studied at 3 weeks and 3 months.

The use of 2 other polymers has also been explored. Intraoperative and endovascular alginate embolization is feasible and could be useful for *in situ* growth factor delivery. Poloxamer, a thermoreversible gel, can provide a safe temporary and reversible arterial occlusion, and as such could be used to deliver molecules to the arterial wall using a transcatheter technique.

Certain properties of CHEM, such as its shape memory, porosity, low thrombogenicity and low inflammatory response are promising for the design of embolic tools. CHEM embolization caused complete and permanent occlusion of maxillary arteries. Aneurysms treated with CHEM did not show significant recanalisation at 3 months. Additional work should be done to improve miniaturization of the material to meet requirements for the transcatheter delivery to cerebral aneurysms. The use of CHEM as

an embolic agent in the treatment of aortic aneurysms in combination with stent-grafts is more realistic and should be evaluated.

These polymers (CHEM, alginate and poloxamer) are promising materials for the development of a « bioactive » strategy designed to improve results of endovascular treatment of aneurysms.

| | | |
|----------|--|----|
| 2.1.2.5. | Faiblesses du traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens et améliorations à apporter | 22 |
| 2.1.3. | <i>Rapports coûts-bénéfices des interventions endovasculaires</i> | 24 |
| 2.1.4. | <i>Problématiques liées aux méthodes endovasculaires de traitement des anévrismes</i> | 25 |
| 2.1.4.1. | Généralités..... | 25 |
| 2.2. | MÉCANISMES DE GUÉRISON DES LÉSIONS VASCULAIRES | 27 |
| 2.2.1. | <i>Généralités</i> | 29 |
| 2.2.2. | <i>Thrombose</i> | 32 |
| 2.2.3 | <i>Réaction inflammatoire</i> | 35 |
| 2.2.4. | <i>Formation néointimale et recanalisation</i> | 37 |
| 2.3. | GÉNÉRALITÉS SUR L'EMBOUSION ENDOVASCULAIRE | 39 |
| 2.3.1. | <i>Caractéristiques idéales de l'agent embolisant</i> | 39 |
| 2.3.2. | <i>Biomécanique</i> | 41 |
| 2.3.3. | <i>Biocompatibilité</i> | 42 |
| 2.4. | MÉTHODES EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR TESTER LES AGENTS OCCLUSIFS . | 45 |
| 2.4.1. | <i>Modèles in vitro</i> | 45 |
| 2.4.1.1. | Modèles hémodynamiques..... | 46 |
| 2.4.2. | <i>Modèles animaux</i> | 47 |
| 2.4.2.1. | Généralités..... | 47 |
| 2.4.3. | <i>Avantages et inconvénients des modèles animaux</i> | 48 |
| 2.5. | LES POLYMÈRES | 53 |
| 2.6. | LE CHEM | 54 |
| 2.6.1. | <i>Mise en situation</i> | 54 |
| 2.6.2. | <i>Composition</i> | 54 |
| 2.6.3. | <i>Mémoire de forme du CHEM</i> | 57 |
| 2.7. | AUTRES POLYMÈRES | 60 |
| 2.7.1. | <i>L'alginate</i> | 60 |
| 2.7.2. | <i>Le poloxamère</i> | 61 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| CHAPITRE 3. | DÉTAILS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTAUX | 64 |
| 3.1. | MATÉRIEL | 64 |
| 3.1.1. | <i>CHEM</i> | 64 |
| 3.2. | MÉTHODES | 64 |
| 3.2.1. | <i>Biocompatibilité</i> | 64 |
| 3.2.1.1. | Cytotoxicité | 64 |
| 3.2.1.2. | Mutagénicité | 67 |
| 3.2.1.2.1. | Justification du système réactif | 68 |
| 3.2.1.2.2. | Extraction | 68 |
| 3.2.1.2.3. | Étude principale | 68 |
| 3.2.1.2.4. | Contrôles | 69 |
| 3.2.1.2.4.1. | Contrôle de l'essai | 69 |
| 3.2.1.2.4.2. | Contrôle des souches | 69 |
| 3.2.1.2.5. | Observation et analyse des données | 70 |
| 3.2.2. | <i>Tests in vivo</i> | 70 |
| 3.2.2.1. | Anévrismes expérimentaux et occlusion endovasculaire d'artères maxillaires | 70 |
| 3.2.2.2. | Pathologie | 72 |
| CHAPITRE 4. | COLD HIBERNATED ELASTIC MEMORY FOAMS FOR ENDOVASCULAR INTERVENTIONS | 74 |
| 4.1. | ABSTRACT | 76 |
| 4.2. | INTRODUCTION | 77 |
| 4.3. | MATERIAL AND METHOD | 78 |
| 4.3.1. | <i>Material</i> | 78 |
| 4.3.1.1. | CHEM Polyurethane | 78 |
| 4.3.2. | <i>Methods</i> | 78 |
| 4.3.2.1. | CHEM cytotoxicity | 78 |
| 4.3.2.2. | CHEM Mutagenicity | 79 |

| | | |
|---------------------------|--|------------|
| 4.3.2.3. | Experimental aneurysms and angiography | 79 |
| 4.3.2.4. | Histology | 81 |
| 4.4. | RESULTS | 82 |
| 4.4.1. | <i>CHEM cytotoxicity and mutagenicity</i> | 82 |
| 4.4.2. | <i>Angiographic findings</i> | 82 |
| 4.4.3. | <i>Macroscopic observations</i> | 83 |
| 4.4.4. | <i>Histological findings</i> | 84 |
| 4.5. | DISCUSSION | 86 |
| 4.6. | CONCLUSION..... | 92 |
| 4.7. | REFERENCES | 94 |
| CHAPITRE 5. | DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 98 |
| 5.1. | LE CHEM COMME AGENT EMBOLISANT | 98 |
| 5.2. | BIOCOMPATIBILITÉ <i>IN VITRO</i> | 100 |
| 5.3. | ÉTUDES <i>IN VIVO</i> | 101 |
| 5.4. | DIFFICULTÉS LIÉES À L'UTILISATION DU CHEM COMME AGENT EMBOLISANT . | 105 |
| 5.5. | APPLICATIONS POTENTIELLES ET TRAVAUX FUTURS | 106 |
| CHAPITRE 6. | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 109 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | | 113 |
| ANNEXES | | 140 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 2.1. Différentes étapes dans la guérison après l'introduction endovasculaire. | 31 |
| Tableau 3.1. Détermination qualitative de la cytotoxicité | 66 |
| Tableau 3.2. Génotype des souches TA utilisées..... | 67 |
| Table 4.1. Angiographic scores of aneurysms treated with CHEM..... | 82 |

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1.** Aspect morphologique des anévrismes. *Gauche:* Illustration montrant un anévrisme sacculaire (McMahon, 2003). *Droite:* Anévrisme fusiforme au niveau de l'aorte abdominale (GUIDANT, 2003). 5
- Figure 2.2.** Anévrisme de l'aorte abdominale détecté par tomодensitométrie. *Gauche :* Image montrant l'aorte abdominale au niveau des reins (flèches creuses), portant un anévrisme (flèches pleines). *Droite :* Image reconstruite présentant une projection frontale d'un anévrisme infrarénal bilobé (triangles pleins). Les artères rénales sont bien visibles et on distingue une sténose de l'artère rénale proximale droite (flèche creuse). L'anévrisme s'étend aussi à l'artère iliaque (triangle vide) (Sparks, Johnson et Meyer, 2002). 7
- Figure 2.3.** Stent-graft. *Gauche :* Aorte abdominale portant un large anévrisme. *Droite :* Anévrisme traité à l'aide d'un stent-graft (Mayo Clinic, 1999). 9
- Figure 2.4.** Fuites péri-prothétiques. Schéma représentant un anévrisme de l'aorte abdominale traité à l'aide d'un stent-graft. Les fuites de types I et II sont illustrées. 10
- Figure 2.5.** Principales artères du cerveau et principaux sites de formation d'anévrismes. 14
- Figure 2.6.** Schéma représentant un anévrisme sacculaire et montrant le collet, la poche anévrismale et l'artère porteuse. 15
- Figure 2.7.** Schéma représentant une rupture d'anévrisme sacculaire. 17
- Figure 2.8.** *Gauche :* Anévrisme non rompu détecté par tomодensitométrie. *Droite :* anévrisme rompu avec hémorragie méningée. 18
- Figure 2.9.** Traitement chirurgical *versus* traitement endovasculaire. *Gauche:* Traitement chirurgical par apposition d'un clip au collet de l'anévrisme. *Droite:* Traitement endovasculaire par remplissage de la poche anévrismale à l'aide de spires de platine (McMahon, 2003). 20

- Figure 2.10.** Anévrisme de bifurcation traité à l'aide de spires de platine. Gauche : avant traitement. Droite : oblitération complète. 21
- Figure 2.11.** Anévrismes traités à l'aide de spires de platine. Gauche : Recanalisation. Droite : Anévrisme guéri avec néointima épaisse au collet. Encart : Photographie d'une spire détachable de Guglielmi..... 21
- Figure 2.12.** Récidive angiographique. Angiographie montrant un anévrisme géant (gauche) et ce même anévrisme après occlusion à l'aide de spires de platine, malheureusement suivie d'une récidive à 6 mois (flèche). 23
- Figure 2.13.** Guérison et recanalisation suite à l'occlusion anévrismale à l'aide de spires de platine : a) spires emplissant la cavité anévrismale, b) migration des cellules musculaires lisses vasculaires, c) migration des cellules endothéliales, d) formation d'une fente de recanalisation endothélialisée..... 28
- Figure 2.14.** Forces hémodynamiques exercées sur la paroi vasculaire à une bifurcation. Le sang passe de l'artère parente aux artères secondaires, dont l'aire de leurs sections transversales combinées est généralement inférieure en surface à celle de l'artère parente. Le flux sanguin est donc ralenti. L'énergie cinétique et le momentum du sang en excès sont donc dissipés à l'apex, endommageant les tissus et favorisant la turbulence. Le profil de vitesse est aussi représenté. La longueur des flèches est proportionnelle à la vitesse. Les vitesses les plus élevées se rencontrent dans la région de l'apex, où on observe un stress hémodynamique maximal (Tiré de Hademenos et Massoud, 1997). 52
- Figure 2.15.** Réaction chimique de base permettant la préparation des polyuréthanes. 56
- Figure 2.16.** Photographie du CHEM prise à l'aide d'un microscope électronique à balayage..... 56
- Figure 2.17.** Cycle de transformation du CHEM. Le CHEM est à son état élastique lorsque la température est au-dessus de sa T_g (température de transition vitreuse), on peut alors le comprimer en un très petit volume. Lorsque la température descend sous sa T_g (état rigide), le CHEM garde cette forme

| | |
|--|----|
| compressée. Il reprend sa forme originale si la température remonte au-dessus de sa Tg (Sokolowski et Hayashi, 2003)..... | 59 |
| Figure 2.18. Structure chimique des alginates (Chaplin, 2003)..... | 61 |
| Figure 2.19. Structure chimique du poloxamère 407..... | 62 |
| Figure 3.1. Construction d'un anévrisme expérimental chez le chien..... | 71 |
| Figure 3.2. Représentation schématique de la classification des résultats angiographiques (Roy <i>et al.</i> 1997)..... | 72 |
| Figure 4.1. Angiographic findings 3 weeks after surgical construction and CHEM embolization. Oblique projections during selective carotid angiography show: (A) completely occluded aneurysm (angiographic score of 0), with no residual flow entering in the aneurysm; (B) dog ear (score of 1), or a small unilateral segment of the neck; (C) residual neck (score of 2); (D) residual aneurysm (score of 3). Arrows are indicating residual opacification of the aneurysmal cavity..... | 81 |
| Figure 4.2. Macroscopic and microscopic appearance of lateral wall common carotid aneurysms embolized with CHEM sponges, at 3 and 12 weeks. (A-I) Healed aneurysms, with formation of a thick neointima. The first aneurysm (A-C) shows only a small crescent of recanalization (arrows), and the two others (D-I) are perfectly healed. Macrophotographs of aneurysm necks "en face" (A, D, G), and of axial sections of aneurysms (B, E, H). C, F and I are microscopic views of axial sections (original magnification X20)..... | 84 |
| Figure 4.3. Up: CHEM processing cycle. Structures of any shape, made of CHEM foam, are compacted to small volumes in a flexible state above the Tg and later cooled below Tg to a glassy state, to be stowed for unlimited periods below Tg. The stowed structure can be heated above Tg to a flexible state and the original shape will be precisely restored. A fully deployed structure can be rigidized by cooling below Tg to a glassy state. Down: Deployed and stowed (arrow) CHEM structures (rods)..... | 88 |

- Figure 5.1.** Hydrocoil®, MicroVention, CA, USA. Lorsqu'il est introduit dans l'anévrisme, l'hydrogel présent autour de la spire prend de l'expansion, permettant un remplissage plus complet de l'anévrisme entre les spires et empêche du même coup l'accumulation de grandes quantités de sang. 108
- Figure 6.1.** Thérapie génique *ex-vivo*. Le CHEM pourrait être utilisé comme véhicule de transport de cellules ayant subi une transfection. 111

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| ANNEXE 1. 2 ^e ARTICLE : Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery. AJNR Am J Neuroradiol. 2003 Jun-Jul;24(6):1214-1221..... | 140 |
| ANNEXE 2. 3 ^e ARTICLE: Temporary vascular occlusion with poloxamer 407. Sous presse dans Biomaterials. | 166 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------|---|
| AAA | anévrisme de l'aorte abdominale |
| AVC | accident vasculaire cérébral |
| CaCl ₂ | chlorure de calcium |
| CHEM | <i>Cold Hibernated Elastic Memory</i> |
| cm | centimètre |
| CML | cellule musculaire lisse |
| CMLV | cellule musculaire lisse vasculaire |
| °C | degré Celsius |
| CO ₂ | dioxyde de carbone |
| DE | diamètre externe |
| DO | densité optique |
| EtO | <i>ethylene oxide</i> |
| F | french |
| g | gramme |
| GDC | <i>Guglielmi detachable coil</i> |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| kg | kilo |
| MAV | malformation artérioveineuse |
| MEM | milieu essentiel minimal |
| ml | millilitre |
| mm | millimètre |
| MMF | matériaux à mémoire de forme |
| MMP | <i>matrix metalloproteinase</i> |
| PDGF-BB | <i>platelet-derived growth factor-BB</i> |
| SMA | <i>shape memory alloy</i> |
| SMP | <i>shape memory polymer</i> |
| SMC | <i>smooth muscle cell</i> |

| | |
|----------------|--|
| T_g | température de transition vitreuse |
| TGF- β_1 | <i>transforming growth factor β_1</i> |
| VSMC | <i>vascular smooth muscle cell</i> |

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Les anévrismes artériels sont des pathologies vasculaires fréquentes qui demeurent le plus souvent silencieuses jusqu'au jour de leur rupture, un évènement grave et souvent fatal. Les anévrismes sacculaires cérébraux et les anévrismes de l'aorte abdominale sont les plus fréquents.

Le traitement classique des anévrismes cérébraux consiste en une chirurgie lourde au niveau de la tête, mais la voie endovasculaire est de plus en plus utilisée. Cette méthode a été développée dans le but de réduire les risques et l'inconfort de l'intervention, ainsi que dans le but d'accélérer la convalescence. Le traitement endovasculaire est un procédé minimalement invasif, qui réduit le temps d'hospitalisation et les coûts liés au traitement.

L'occlusion endovasculaire des anévrismes intracrâniens se fait le plus fréquemment à l'aide de spires détachables de Guglielmi (Guglielmi Detachable Coils ou GDC). Une étude randomisée de grande envergure a montré que les patients atteints d'une hémorragie intracrânienne suite à la rupture anévrismale bénéficient d'une meilleure évolution s'ils sont traités par spires plutôt que par chirurgie (Molyneux *et al.* 2002). Cependant, l'occlusion de l'anévrisme est souvent incomplète et la revascularisation ou récurrence angiographique survient à plus long terme chez 10-40% des patients. Ces récurrences peuvent être à l'origine de resaignements chez 1% des patients (Raymond, Guilbert, Weill *et al.* 2003; Murayama *et al.* 2003).

Jusqu'en 1991, le traitement des anévrismes de l'aorte abdominale se faisait exclusivement par voie chirurgicale, soit par remplacement prosthétique du segment atteint. Depuis, il existe une alternative endovasculaire moins morbide, qui consiste en l'introduction d'un greffon synthétique monté sur une armature métallique expansible (stent-graft). Cependant, l'efficacité de cette alternative endovasculaire est compromise

par l'apparition de fuites péri-prothétiques, qui occasionnent des échecs de traitement, des récidives, ainsi que des risques de rupture tardive (White *et al.* 1997).

Ces difficultés propres aux approches endovasculaires poussent de nombreuses équipes à la recherche de nouvelles techniques et de nouveaux matériaux destinés à améliorer l'efficacité à long terme du traitement endovasculaire. Nous mentionnerons donc, dans ce mémoire, nos travaux concernant 3 polymères destinés à ces approches endovasculaires.

L'élaboration d'un agent embolisant nécessite l'évaluation de plusieurs paramètres. Nous reverrons l'évaluation expérimentale des nouveaux agents embolisants grâce aux modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces modèles permettent la caractérisation des diverses réactions biologiques engendrées par le matériau, ainsi que l'observation de son comportement mécanique dans le système visé.

L'objet principal de cette maîtrise est un nouveau polyuréthane à mémoire de forme, le CHEM, qui pourrait être utile au traitement des anévrismes intracrâniens ou aortiques.

Le CHEM est un polyuréthane constitué de 2 composants en proportions variables, auxquels on a ajouté un agent gonflant, afin d'obtenir un matériau spongieux. C'est un polymère à mémoire de forme (PMF), c'est-à-dire qu'en dessous de sa température de transition vitreuse (T_g) il peut être conservé sous une forme rigide, comprimée, mais qu'il se déploie lorsque la température augmente au-dessus de sa T_g (Sokolowski, Chmielewski, Hayashi *et al.* 1999).

Certains biomatériaux ont largement été utilisés comme matière première pour la construction d'outils ayant un effet purement mécanique, comme dans le cas des prothèses endovasculaires servant à maintenir ouvert le site de dilatation d'une sténose, de l'occlusion mécanique des anévrismes ou des agrafes pour la fermeture de fractures.

On conçoit de plus en plus de matériaux bioactifs, c'est-à-dire capables de modifier la réaction biologique secondaire à leur implantation ou d'agir localement sur la pathologie visée. Il peut s'agir de matériaux radioactifs permettant une irradiation bêta (Raymond, Leblanc, Desfaits *et al.* 2002), de matériaux libérant des drogues, comme les stents au Sirolimus (Windecker, Roffi et Meier, 2003), de matériaux permettant la libération de facteurs de croissance (Mierisch *et al.* 2002; Annexe 1) ou permettant une greffe de cellules (Orive *et al.* 2002) ou même une thérapie génique (Ochiya *et al.* 2001; Ribourtout *et al.* Sous presse). Dans ce contexte, nous avons également exploré 2 autres polymères qui pourraient remplir ce type de fonction, l'alginate et le poloxamère.

L'alginate est un agent de remplissage fréquemment utilisé dans l'alimentation, qui peut servir de véhicule capable de réaliser des greffes cellulaires (Mullen, Maruyama et Smith, 2000). Il peut aussi agir comme agent de transport et de libération de molécules actives telles que les facteurs de croissance (Annexe 1). Nous l'avons testé comme agent embolisant « bioactif » dans nos anévrismes expérimentaux (Annexe 1).

Le poloxamère est un hydrogel thermo-réversible. Ici, sa principale fonction serait de stopper la circulation afin de réaliser le dépôt endovasculaire local d'un agent thérapeutique ou de protéger un lit vasculaire normal des effets d'un agent embolisant ou d'un agent cytotoxique. Nos expériences ont mis en évidence que le poloxamère est tout à fait approprié à l'occlusion temporaire d'un vaisseau (Annexe 2).

CHAPITRE 2. ÉTAT DES CONNAISSANCES

2.1. LES ANÉVRISMES

Un anévrisme consiste en un élargissement ou gonflement de la paroi d'un vaisseau, qui peut apparaître au niveau de n'importe quelle structure vasculaire, mais qui affecte plus souvent les artères. Les deux sites de formation anévrismale les plus fréquents sont l'aorte abdominale et les vaisseaux intracrâniens. La nature de ces 2 lésions semble différente.

Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) sont fusiformes (figure 2.1) et généralement associés à des changements athéroscléreux avancés (Morimoto *et al.* 2002), bien que leur apparition puisse résulter d'une atteinte dégénérative de la média ou de diverses maladies du tissu conjonctif. L'âge et le sexe masculin sont fortement liés aux AAA. Le tabagisme est le seul facteur associé au développement des AAA auquel il est possible de remédier (Manning *et al.* 2002). Il peut accroître le taux de croissance des AAA de 20% à 25% (Lee, 2003).

Les anévrismes cérébraux sont sacculaires (figure 2.1) et se développent probablement à la suite de défauts congénitaux au niveau de la média artérielle, en combinaison avec une dégénérescence acquise de la paroi (Morimoto *et al.* 2002). S'il existe parfois une incidence familiale suggestive d'un facteur génétique unique, et si la pathologie est quelquefois associée à une maladie systémique du tissu conjonctif, à une infection ou à une lésion tumorale, la plupart des cas sont sporadiques et la pathogenèse demeure controversée. De nombreux facteurs environnementaux sont susceptibles de prédisposer à l'hémorragie anévrismale, mais le tabagisme est le seul facteur retenu dans toutes les populations étudiées (Schievink, 1997). En revanche, l'hypertension, la consommation d'alcool, ainsi que sur l'utilisation de contraceptifs oraux sont mentionnés dans plusieurs études épidémiologiques (Okamoto *et al.* 2003).

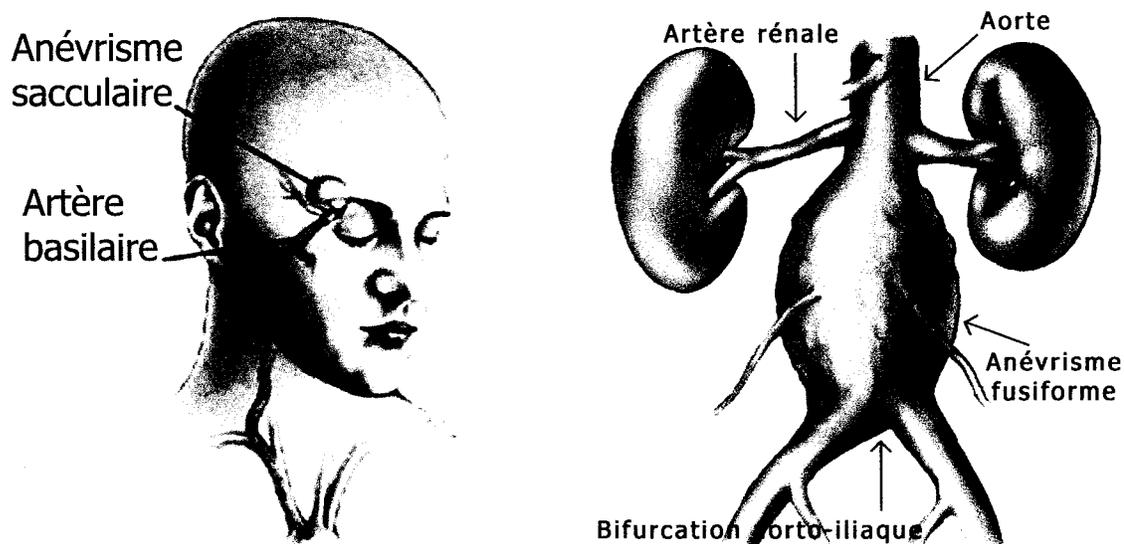


Figure 2.1. Aspect morphologique des anévrismes. *Gauche:* Illustration montrant un anévrisme sacculaire (McMahon, 2003). *Droite:* Anévrisme fusiforme au niveau de l'aorte abdominale (GUIDANT, 2003).

2.1.1. Anévrismes de l'aorte

2.1.1.1. Nature, fréquence et risques de rupture

Les anévrismes aortiques affectent le plus souvent le segment abdominal de l'aorte. Dans 90% des cas, les anévrismes impliquent l'aorte entre l'origine des artères rénales et la bifurcation aorto-iliaque (figure 2.1) et l'extension aux artères iliaques primitives est variable. Lors de la formation d'un anévrisme, un étirement de toutes les couches de la paroi artérielle peut être observé (O'Connor, 2002).

Les AAA sont de plus en plus fréquents (Melton *et al.* 1984). Ils affectent 5 % de la population adulte et, de façon prédominante, les patients âgés de plus de 60 ans chez qui

la co-morbidité pulmonaire, cardiaque ou rénale est élevée (Lloyd *et al.* 1996; Brown *et al.* 1981; Crawford *et al.* 1981). Une rupture d'anévrisme aortique entraîne, presque invariablement, le décès. C'est la 14^e plus importante cause de mortalité en Amérique du Nord.

2.1.1.2. Dépistage et imagerie

Les anévrismes aortiques sont le plus souvent silencieux jusqu'au jour de la rupture. Une douleur soudaine et très intense dans l'abdomen ou le dos peut annoncer une rupture. On peut détecter les AAA non rompus lors de l'examen clinique ou à l'occasion d'un examen diagnostique (échographie par exemple), le plus souvent réalisé pour des « symptômes vagues » tels que des douleurs abdominales ou lombaires. Les anévrismes non rompus peuvent également causer des dommages en interrompant la circulation sanguine, ou en engendrant la compression ou l'érosion d'organes voisins (rachis, sternum, côtes, etc.) (Johansen, 1983).

Le test d'imagerie pré-opératoire le plus fiable est la tomodensitométrie (Pillari *et al.* 1988) (figure 2.2). Elle est largement disponible et bien tolérée par le patient (Whitaker, 2001). La tomodensitométrie spirale permet en effet une étude angiographique 3D non invasive, par rapport à l'étude angiographique conventionnelle qui nécessite le cathétérisme artériel. Elle permet aussi une meilleure visualisation des vaisseaux originant de l'aorte abdominale et leur localisation par rapport à l'anévrisme (White *et al.* 2000). La tomodensitométrie est aussi considérée comme le « Gold Standard » dans la détection de fuites péri-prothétiques (Karch *et al.* 1999) et permet de suivre leur évolution (White *et al.* 2000).

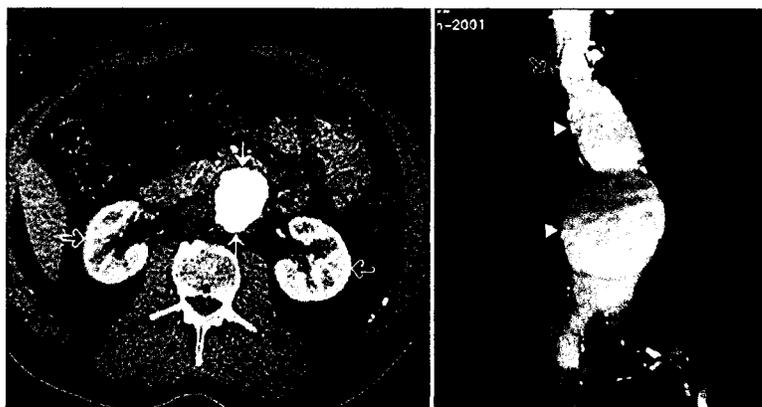


Figure 2.2. Anévrisme de l'aorte abdominale détecté par tomodensitométrie. *Gauche* : Image montrant l'aorte abdominale au niveau des reins (flèches creuses), portant un anévrisme (flèches pleines). *Droite* : Image reconstruite présentant une projection frontale d'un anévrisme infrarénal bilobé (triangles pleins). Les artères rénales sont bien visibles et on distingue une sténose de l'artère rénale proximale droite (flèche creuse). L'anévrisme s'étend aussi à l'artère iliaque (triangle vide) (Sparks, Johnson et Meyer, 2002).

2.1.1.3. Traitements disponibles

Le traitement standard des anévrismes aortiques consiste à remplacer, par chirurgie ouverte, le segment atteint par une prothèse synthétique. Ce traitement, bien qu'efficace, est associé à une morbidité et à un taux de mortalité post-opératoire significatif variant entre 1.4 % et 7.6 % (Johnston *et al.* 1994; Ernst 1993; Roger *et al.* 1989; Katz, Stanley et Zelenock, 1994). Ce taux peut augmenter à 20 % lorsque des pathologies systémiques importantes coexistent (maladie coronarienne, antécédents d'accident vasculaire cérébral, bronchopneumopathie obstructive chronique, etc.) (McCombs et Roberts, 1979; Gardner *et al.* 1978; Faries *et al.* 2002). Les autres désavantages de la chirurgie conventionnelle sont les coûts élevés et la convalescence prolongée, ainsi qu'une incidence d'impuissance sexuelle post-opératoire de 20% (Verdant, 2002).

Une évolution technologique récente a mené au développement de prothèses (ou stent-grafts), implantées par voie endovasculaire. Celles-ci offrent une alternative moins invasive que la chirurgie conventionnelle, puisqu'elles s'introduisent par voie fémorale (au niveau de l'artère de l'aîne), sans intervention abdominale, tout en permettant l'exclusion de l'anévrisme.

2.1.1.4. Attraitis du traitement endovasculaire

Le traitement par voie endovasculaire des anévrismes aortiques implique une période d'hospitalisation moins longue, en particulier aux soins intensifs. De plus, comparé à la chirurgie, ce mode de traitement implique une diminution des complications médicales (Tonnessen *et al.* 2002).

Juan Parodi a été le premier à décrire, en 1991, le traitement d'un anévrisme aortique abdominal par voie endovasculaire chez l'humain (Parodi, Palmaz et Barone, 1991). Depuis son introduction, on estime à plus de 25 000 le nombre de patients ayant bénéficié de cette technique à travers le monde (Jacobs *et al.* 2003). La faisabilité et l'efficacité à court terme du traitement endovasculaire des AAA ne sont plus à démontrer (Dattilo *et al.* 2002).

Les stent-grafts sont habituellement constitués d'un support auto-expansif, le plus souvent composé d'un alliage de nickel et de titane (Nitinol), habillé d'une mince couche de matériel synthétique de recouvrement destiné à exclure l'anévrisme de la circulation (figure 2.3). Les 3 matériaux de recouvrement les plus communs consistent en une étoffe de polyester, une gaine de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou une fine membrane de polyuréthane (Formichi *et al.* 2000).

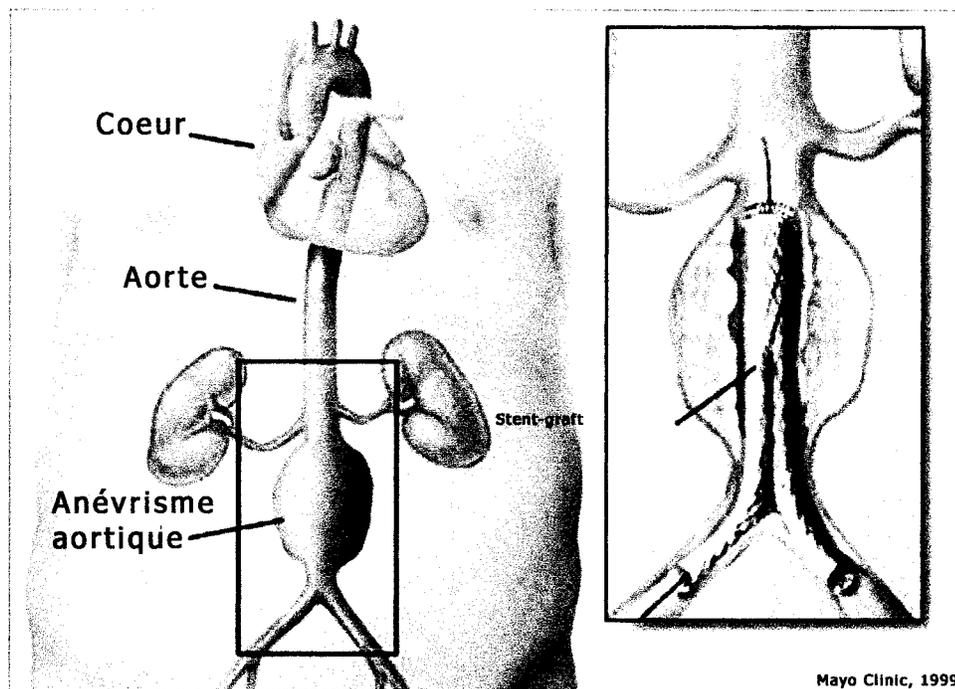


Figure 2.3. Stent-graft. Gauche : Aorte abdominale portant un large anévrisme. Droite : Anévrisme traité à l'aide d'un stent-graft (Mayo Clinic, 1999).

2.1.1.5. Faiblesses du traitement endovasculaire des anévrismes aortiques et améliorations à apporter

Les premières générations de stent-grafts étaient prédisposées à de nombreux problèmes de déploiement, de migration, de bris du greffon, etc. Malgré une nette amélioration des dispositifs des dernières générations et malgré l'obtention de résultats comparables avec le traitement endovasculaire par rapport au standard chirurgical, on s'interroge de plus en plus sur la durabilité du traitement par prothèse (Parodi, Ferreira et Beebe, 2002). À la suite d'un traitement endovasculaire, de nouvelles interventions sont souvent nécessaires. Pour un important pourcentage de patients, l'évolution des anévrismes, à moyen terme, demeure insatisfaisante. En effet, la persistance du flux sanguin dans l'anévrisme après implantation du stent-graft affecte 10-37% des patients et réduit

considérablement l'efficacité du traitement (Dattilo *et al.* 2002; Schurink, Aarts et van Bockel, 1999; White *et al.* 1997). La présence de ces « endoleaks », ou fuites péri-prothétiques, est souvent associée à la persistance de l'AAA ou même, plus rarement, à sa rupture (Dattilo *et al.* 2002; Schurink, Aarts et van Bockel, 1999), documentée dans 0.5% à 1% des cas (White *et al.* 2000). La plupart des ruptures liées à la présence de fuites péri-prothétiques seraient dues à des fuites de type I (figure 2.4) (White *et al.* 2000; Bernhard *et al.* 2002), qui consistent en un passage direct du sang entre la paroi aortique et la prothèse, le plus souvent à l'extrémité proximale de celle-ci. Ce type de fuite peut découler d'une défaillance du système d'encrage, d'une dilatation du collet aortique, de la migration du dispositif (Bernhard *et al.* 2002) ou d'une incorporation tissulaire inadéquate du dispositif.

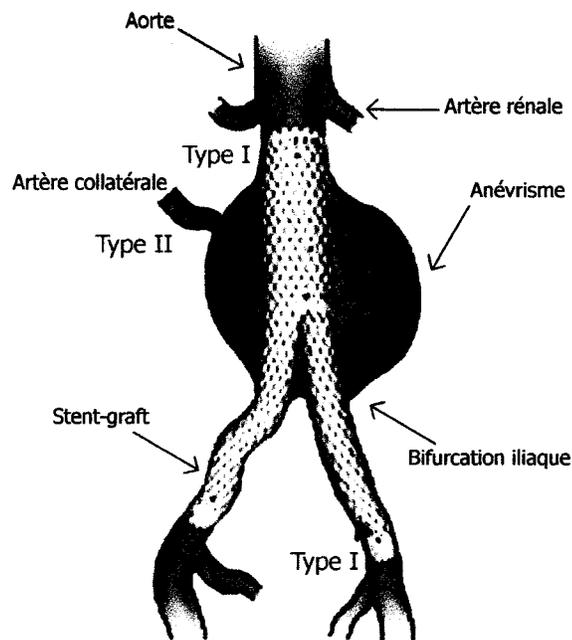


Figure 2.4. Fuites péri-prothétiques. Schéma représentant un anévrisme de l'aorte abdominale traité à l'aide d'un stent-graft. Les fuites de types I et II sont illustrées.

La fuite péri-prothétique s'observe par opacification de l'anévrisme, vue à l'angiographie ou à la tomodensitométrie, après l'implantation du stent-graft. Des zones de fuites péri-prothétiques mineures peuvent se sceller spontanément dans approximativement 50% des cas (Mialhe, Amicabile et Becquemin, 1997). Il faut comprendre qu'une différence fondamentale entre le traitement chirurgical et l'approche endovasculaire est l'absence de suture attachant de façon étanche les 2 extrémités du greffon à la paroi.

La migration de l'implant après traitement peut entraîner une fuite de type I. La dilatation progressive du collet proximal de l'anévrisme serait une cause majeure de migration distale de stent-grafts. Une amélioration de la fixation proximale et l'incorporation cellulaire de la prothèse à la paroi seraient nécessaires pour assurer une stabilité à long terme (Resch *et al.* 1999). En effet, la migration peut être asymptomatique, mais si elle s'associe à une fuite péri-prothétique proximale, elle peut nécessiter des procédures endovasculaires ou chirurgicales additionnelles, ou causer la rupture de l'anévrisme (Kalliafas *et al.* 2002).

Les fuites péri-prothétiques peuvent être directement liées à la prothèse (types I, III et IV) ou être indépendantes de la prothèse (type II). Les fuites de type II résultent d'une vascularisation de l'anévrisme par inversion de flux au niveau des artères lombaires ou de l'artère mésentérique inférieure. L'absence de ligature des artères lombaires lors du traitement endovasculaire explique ce phénomène. Les fuites de type III peuvent résulter de la rupture du matériel, de la présence d'un défaut au niveau du matériel de recouvrement, d'une fuite entre les composantes ou de la disjonction des composantes d'un implant modulaire (White *et al.* 1998; Veith *et al.* 2002). Quant aux fuites péri-prothétiques de type IV, elles apparaissent suite à la diffusion du sang au travers des pores d'un matériel de recouvrement poreux ou au travers de trous laissés par des sutures, par exemple (White *et al.* 1998).

Une autre des principales causes d'échec dans le traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale est la présence d'« endotension », définie comme étant un état de pression élevée, persistant ou récurrent, à l'intérieur du sac anévrisimal (Gilling-Smith *et al.* 1999; Veith *et al.* 2002). Évidemment, les fuites péri-prothétiques peuvent faire augmenter la pression à l'intérieur de l'anévrisme, jusqu'à engendrer sa rupture, mais il a aussi été démontré qu'un anévrisme peut continuer à prendre de l'expansion même en l'absence de fuite péri-prothétique visible (White *et al.* 1999). En effet, l'endotension peut être maintenue par des fuites péri-prothétiques de faible débit ne pouvant être détectées de manière fiable par l'imagerie conventionnelle, telle que la tomodensitométrie ou l'angiographie (Gilling-Smith *et al.* 1999). L'endotension peut aussi résulter de la transmission de la pression présente au niveau de la lumière aortique (intra stent-graft) vers la paroi anévrismale. La transmission de la pression peut se faire via la paroi du stent-graft (matériel poreux ou défauts dans le matériel), via le thrombus « scellant » une fuite péri-prothétique ou via le thrombus recouvrant le site d'apposition ou d'ancrage du stent-graft (White *et al.* 1999; Gilling-Smith *et al.* 1999).

Les explants de stent-grafts obtenus à l'autopsie ou lors d'une reconversion vers le traitement chirurgical montrent que ceux-ci sont mal incorporés à la paroi vasculaire (Malina *et al.* 2000; McArthur *et al.* 2001). L'histologie révèle une formation néointimale déficiente au collet de ces implants. Cette formation est nécessaire à l'incorporation biologique de substituts artériels textiles. Ces résultats suggèrent que l'attachement des stent-grafts présentement commercialisés est purement mécanique, l'implant étant juxtaposé à la paroi artérielle (ou au thrombus formé *in situ*) et maintenu par la force radiale et/ou des crochets. Ces études ont aussi démontré le manque d'endothélialisation « intra-stents » (Malina *et al.* 2000; McArthur *et al.* 2001).

Même si la thrombose était initialement complète entre le stent-graft et la paroi anévrismale, une recanalisation subséquente est possible. Le contenu cellulaire et la perméabilité du thrombus intracavitaire retrouvé au niveau de l'AAA non traité ont été

explorés. Ces études ont permis d'observer un thrombus de structure complexe, traversé par un réseau continu de canalicules interconnectées, perpendiculaires à la surface luminale (Adolph *et al.* 1997).

2.1.2. Anévrismes intracrâniens

2.1.2.1. Nature, fréquence et risques de rupture

Les anévrismes intracrâniens sont des lésions majoritairement situées au niveau des bifurcations artérielles, le plus souvent sur le polygone de Willis, le réseau anastomotique situé à la base du cerveau. Ils se localisent préférentiellement au niveau de la circulation antérieure, par ordre de fréquence sur l'artère communicante antérieure (41%), l'artère carotide (31%) et la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne (18%). Ils apparaissent plus rarement au niveau de la circulation postérieure, touchant l'artère basilaire et l'artère vertébrale dans 8% et 2% des cas, respectivement (Barth, 2000) (figure 2.5). Occasionnellement, ils peuvent aussi se former sur la paroi latérale d'une artère non ramifiée (Osborn, 1995). Des anévrismes fusiformes et associés à l'athérosclérose, comme ceux de l'aorte, sont beaucoup plus rares au niveau de la vascularisation cérébrale (Barth, 2000).

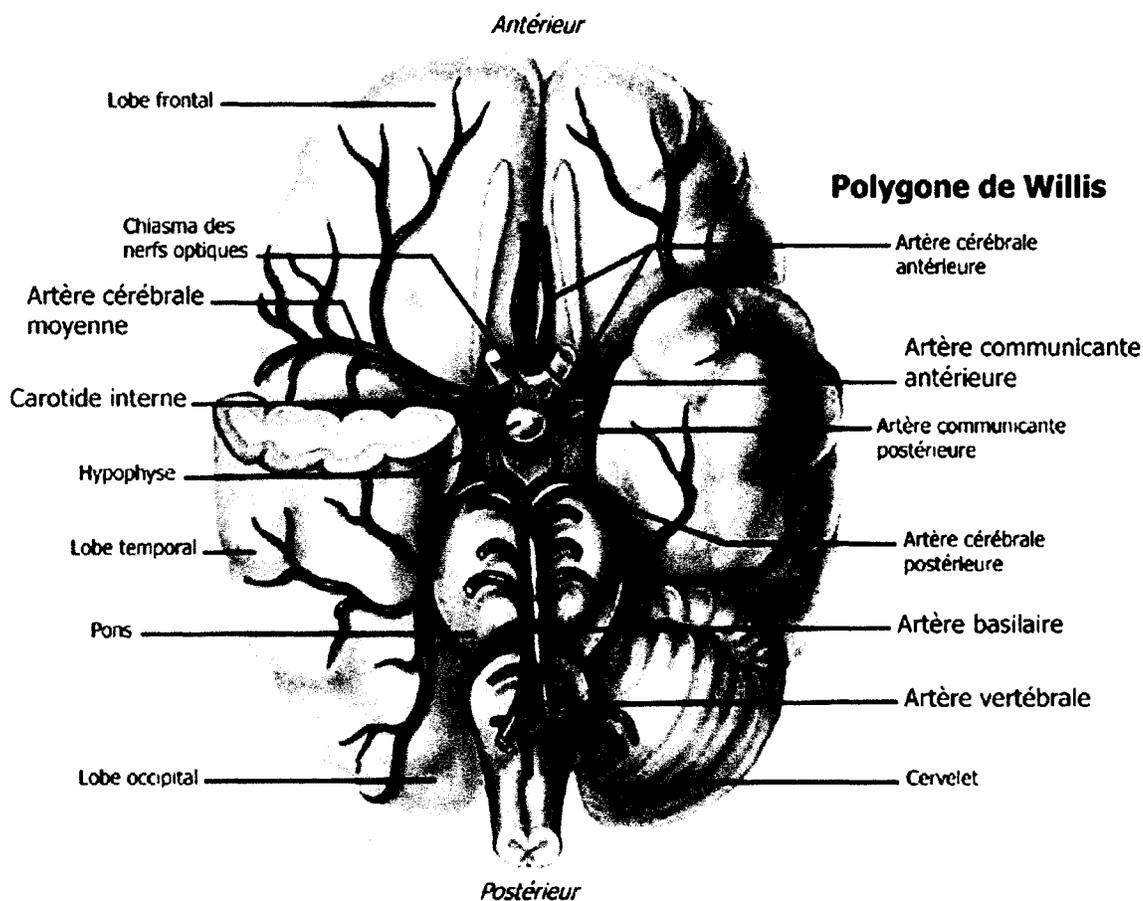


Figure 2.5. Principales artères du cerveau et principaux sites de formation d'anévrismes.

Les anévrismes intracrâniens se présentent, la plupart du temps, sous la forme d'un sac de taille variable, mais toujours à paroi mince, implanté sur la paroi artérielle par l'intermédiaire d'un collet (figure 2.6). Les anévrismes sont souvent classés en 5 sous-groupes, selon leur taille : les micro-anévrismes (< 2 mm), les petits anévrismes (2-6 mm), les anévrismes de taille moyenne (6-15 mm), les gros anévrismes (12-25 mm) et les anévrismes géants (> 25 mm) (Yasargil, 1984).

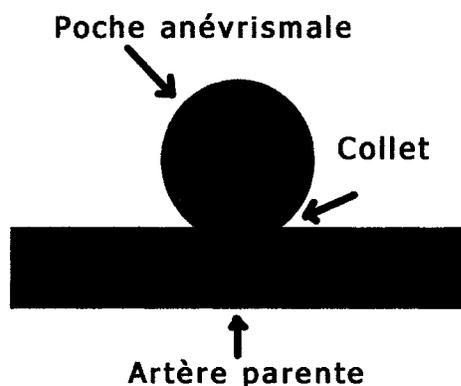


Figure 2.6. Schéma représentant un anévrisme sacculaire et montrant le collet, la poche anévrismale et l'artère porteuse.

L'origine des anévrismes intracrâniens est probablement mixte, acquise et héréditaire (Barth, 2000). La formation des anévrismes intracrâniens est liée à une faiblesse congénitale de la paroi de l'artère, qui se distend sous l'influence de la pression artérielle. Comme la plupart des anévrismes se développent plus tard durant la vie adulte, on croit à l'importance des facteurs acquis. Les anévrismes peuvent être la conséquence de pathologies chroniques, comme l'athérosclérose et l'hypertension artérielle, ou se former à la suite d'un traumatisme crânien (Tremblay, 2003). Des facteurs génétiques semblent prédisposer à la formation anévrismale. Par exemple, de nombreuses maladies héréditaires du tissu conjonctif y sont associées, telles que le syndrome d'Ehlers-Danlos de type IV, le syndrome de Marfan, la neurofibromatose de type I, la dysplasie fibromusculaire et la polykystose rénale autosomique dominante (Schievink, *Neurosurgery*, 1997; Barth, 2000). Il existe également des formes familiales non liées aux maladies du tissu conjonctif ou à d'autres pathologies multisystémiques. On soupçonne une prédisposition héréditaire lorsque des anévrismes sont retrouvés chez au moins 2 parents de premier degré (parents, frères et sœurs, fils et filles) (Barth, 2000).

Les anévrismes intracrâniens sont fréquents : selon la méthode diagnostique utilisée (angiographie ou autopsie) leur prévalence estimée varie de 0.5% à 6% de la population adulte (Johnston *et al.* 2002). L'âge moyen de la rupture anévrismale se situe autour de 45-50 ans et le risque est légèrement supérieur chez les femmes (Kassell *et al.* 1990; Mayberg *et al.* 1994). La découverte d'anévrismes est exceptionnelle chez l'enfant (Roche *et al.* 1988), ce qui, à part les causes traumatiques et infectieuses, parle en faveur d'une pathologie acquise dégénérative (Barth, 2000).

2.1.2.2. Dépistage et imagerie

Les anévrismes sont parfois découverts par hasard lors d'examens de routine ou d'investigations faites pour d'autres causes. Avec la disponibilité croissante de l'imagerie non-invasive, cette découverte est de plus en plus fréquente. D'autres fois, les anévrismes occasionnent des symptômes, tels que céphalées, étourdissements, compression des nerfs ou des tissus cérébraux adjacents. Le risque hémorragique d'une lésion découverte de façon fortuite est faible, de l'ordre de 0.05 à 1% par année. Le traitement chirurgical ou endovasculaire de l'anévrisme non rompu demeure donc controversé (Roy, Milot et Raymond, 2001). Malheureusement, dans la grande majorité des cas (85-95%), la rupture avec hémorragie méningée secondaire constitue la première manifestation de l'anévrisme (Kopitnik et Samson, 1993). On sait, cependant, que 70 % des gens qui font une telle hémorragie ont eu des signes précurseurs dans les heures ou les jours précédents, comme des épisodes de maux de tête inhabituels et subits. Ces maux de tête, que l'on appelle céphalées sentinelles, indiquent souvent qu'il y a eu un saignement mineur ou qu'une rupture d'anévrisme se prépare (Tremblay, 2003).

La rupture anévrismale se présente de façon spectaculaire par une céphalée explosive conduisant rapidement à des altérations de l'état de conscience, jusqu'au coma profond. Cette céphalée peut être accompagnée de nausées et de vomissements. Parmi les individus ayant subi une hémorragie méningée, 50% décèdent à la rupture ou peu de

temps après, et 25% souffrent d'une invalidité permanente, incluant la paralysie et la perte de la parole, de la vision et de la coordination motrice. Les 25% restant ont un risque accru d'accident vasculaire cérébral (AVC), de resaignement ou d'autres complications (Peters *et al.* 2001). Alors que l'incidence des autres types d'AVC a diminué au cours de la dernière décennie, principalement à cause de l'amélioration de la détection et du traitement de l'hypertension, l'incidence d'hémorragie méningée est demeurée relativement constante (Peters *et al.* 2001).

Le point de rupture de l'anévrisme se situe en général au sommet du sac anévrisimal (fundus) (figure 2.7). L'intensité et l'étendue de l'hémorragie dépend de plusieurs facteurs, à savoir l'angle que fait l'anévrisme avec le vaisseau porteur, la taille du point de rupture et la résistance des structures voisines (Barth, 2000).

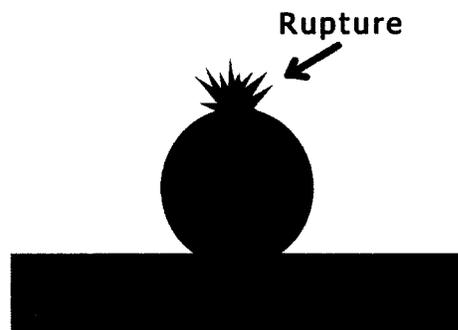


Figure 2.7. Schéma représentant une rupture d'anévrisme sacculaire.

Les anévrismes intracrâniens non rompus peuvent être détectés par des procédés non invasifs tels que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie. Une rupture anévrismale peut être confirmée par tomodensitométrie (figure 2.8) ou par une ponction lombaire, qui révèlent la présence de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens (xanthochromie du liquide céphalo-rachidien), au pourtour du cerveau.

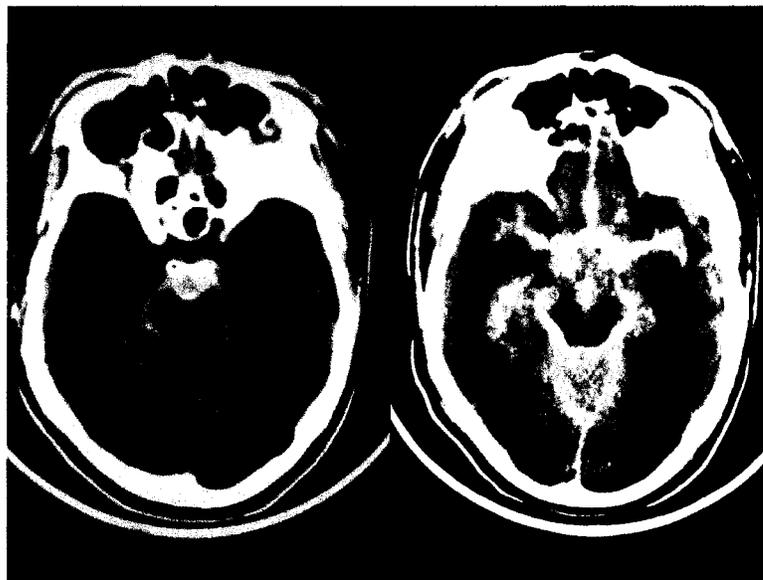


Figure 2.8. Gauche : Anévrisme non rompu détecté par tomodensitométrie. Droite : anévrisme rompu avec hémorragie méningée.

Une hémorragie méningée (ou hémorragie sous-arachnoïdienne) se définit comme étant une effusion de sang dans les espaces liquidiens externes entre l'arachnoïde et la pie-mère . La cause la plus fréquente (environ 80%) est une rupture d'anévrisme à la base du crâne. Typiquement, le sang se répand dans les citernes arachnoïdiennes situées à la surface inférieure du cerveau, là où courent les grosses artères cérébrales. Selon la localisation et la projection de l'anévrisme, le saignement peut aussi se développer dans le parenchyme cérébral (hémorragie intracérébrale), dans le système ventriculaire (hémorragie intraventriculaire) ou même dans l'espace sous-dural entre l'arachnoïde et la dure-mère (hématome sous-dural) (Barth, 2000).

2.1.2.3. Traitements disponibles

Depuis les années 1950 et jusqu'à ces dix dernières années, le traitement de référence des anévrismes artériels intracrâniens était neurochirurgical, par clippage du collet de la

lésion, permettant d'exclure celle-ci de la circulation tout en respectant le vaisseau porteur (figure 2.9). Cette méthode a été considérablement améliorée par le développement de la microchirurgie (assistée par microscope) dans les années 1970 (ANAES, 2000).

Le traitement neurochirurgical des anévrismes présente plusieurs inconvénients : on doit tout d'abord pratiquer une craniotomie (ouverture d'une partie du crâne), le plus souvent fronto-temporale, ce qui implique un risque d'hémorragie à l'ouverture. Certains anévrismes sont peu accessibles à cette approche extérieure. Le cerveau doit souvent être écarté pour améliorer la visibilité des vaisseaux, ce qui peut laisser des contusions. De plus, ce ne sont pas toutes les branches artérielles, en particulier les artères perforantes responsables de la vascularisation de structures nerveuses profondes, qui sont visibles et, au moment de clipper, l'occlusion par inadvertance de ces branches conduit à des déficits postopératoires responsables d'une morbidité élevée.

De nos jours on peut choisir d'opter pour le traitement endovasculaire, moins invasif. Il s'agit ici de remplir la cavité anévrismale de spires de platine (figure 2.9), introduites à l'aide d'un cathéter, acheminé sous contrôle radioscopique (figure 2.10), depuis l'artère de l'aîne. Les spires de platine communément utilisées sont les spires détachables de Guglielmi (GDC ou Guglielmi detachable coils) (Target Therapeutics, Fremont, CA), approuvées en 1995 par la FDA (Food and Drug Administration, USA) (figure 2.11). Après mise en place d'un cathéter à l'intérieur de l'anévrisme, la spire est alors poussée hors du cathéter à l'aide d'un guide en acier inoxydable et s'enroule sur elle-même pour réaliser l'occlusion. Lorsqu'elle est bien en place, un courant électrique de 1mA permet à la spire de se détacher du guide. Cette libération par électrolyse était au départ faite dans le but de provoquer une thrombose de la lumière de l'anévrisme et prévenir ainsi une re-rupture (Barth, 2000). On croyait au départ aux vertus de l'électrothrombose causée par le passage du courant au sein de la spire. On s'est aperçu par la suite qu'il fallait plutôt remplir l'anévrisme par le plus grand volume de platine possible. On ne

peut cependant atteindre qu'un faible pourcentage de remplissage, comme on le verra plus loin. Selon la taille de l'anévrisme, une à plusieurs spires de platine sont nécessaires pour exclure celui-ci de l'artère porteuse. Avec l'expérience clinique et l'amélioration du design des spires, la fréquence d'utilisation des spires a augmenté. Dans certains centres, seuls les patients ne pouvant être traités par embolisation endovasculaire à l'aide de GDC sont aujourd'hui traités par apposition d'un clip chirurgical (Johnston *et al.* 2002).

Le but de l'intervention après la rupture initiale est de prévenir le resaignement, qui risque de survenir chez 30-50% des patients non traités (Kassell *et al.* 1990).

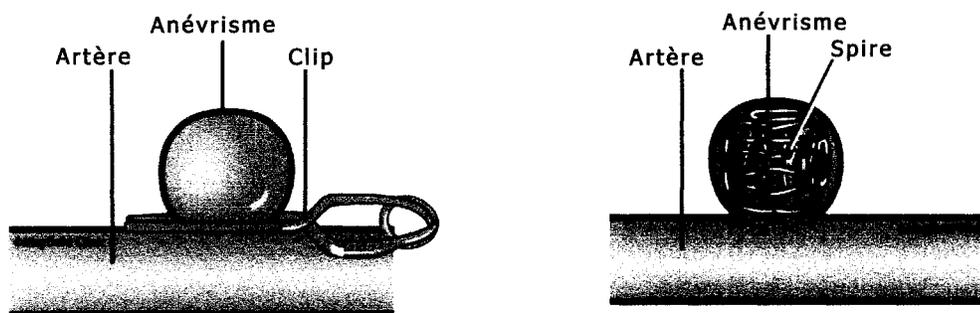


Figure 2.9. Traitement chirurgical *versus* traitement endovasculaire. *Gauche:* Traitement chirurgical par apposition d'un clip au collet de l'anévrisme. *Droite:* Traitement endovasculaire par remplissage de la poche anévrismale à l'aide de spires de platine (McMahon, 2003).

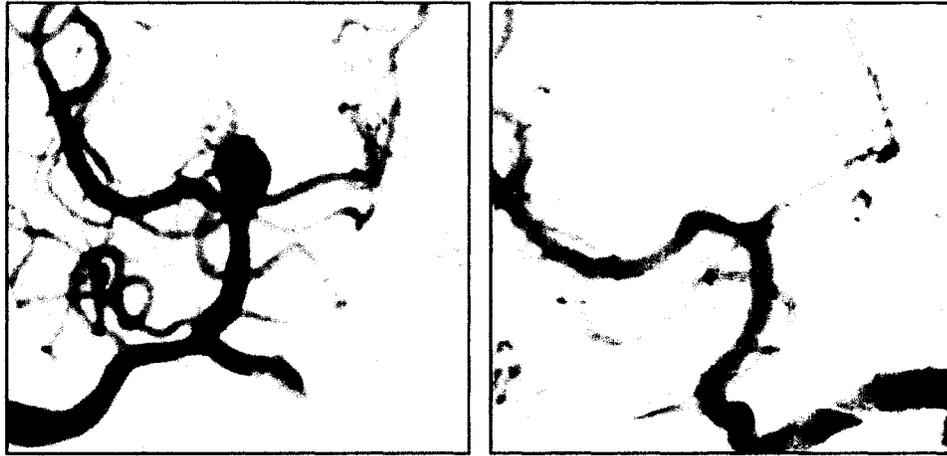


Figure 2.10. Anévrisme de bifurcation traité à l'aide de spires de platine. Gauche : avant traitement. Droite : oblitération complète.



Figure 2.11. Anévrismes traités à l'aide de spires de platine. Gauche : Recanalisation. Droite : Anévrisme guéri avec néointima épaisse au collet. Encart : Photographie d'une spire détachable de Guglielmi.

2.1.2.4. *Attraits du traitement endovasculaire*

Les résultats d'une vaste étude multicentrique prospective randomisée, « International Subarachnoid Aneurysm Trial » (Molyneux *et al.* 2002), montrent que l'intervention endovasculaire à l'aide de spires de platine, chez des patients avec anévrismes intracrâniens rompus, peut augmenter les chances de survie indépendantes, comparé aux résultats obtenus avec l'intervention neurochirurgicale. L'étude fait état d'une diminution de 22,6 % du risque de déficiences graves au bout d'un an chez les patients soumis au traitement endovasculaire par insertion de filaments comparativement aux patients soumis au traitement neurochirurgical par la pose de clips (Molyneux *et al.* 2002).

2.1.2.5. *Faiblesses du traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens et améliorations à apporter*

La chirurgie demeure pour beaucoup le traitement de choix des anévrismes, en raison des risques de récurrences observables à l'angiographie (figure 2.12) jugés trop importants après traitement endovasculaire. En effet, l'occlusion de l'anévrisme est souvent incomplète et la revascularisation, ou récurrence angiographique, survient à plus long terme chez 10-40% des patients. Ces récurrences peuvent être à l'origine de resaignements chez 1% des patients (Raymond, Guilbert, Weill *et al.* 2003; Murayama *et al.* 2003).

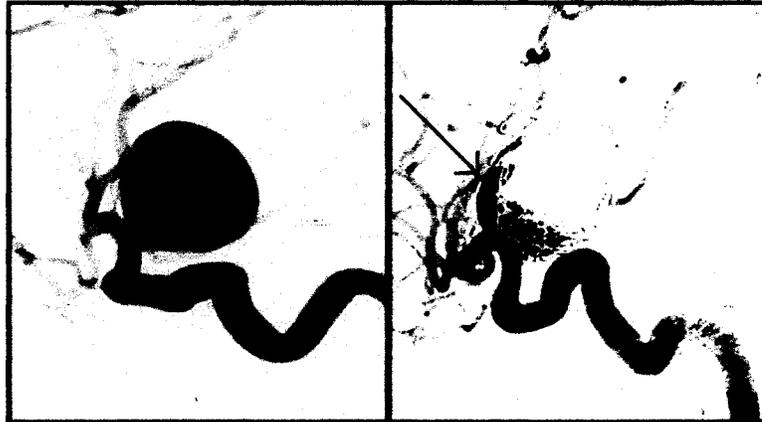


Figure 2.12. Récidive angiographique. Angiographie montrant un anévrisme géant (gauche) et ce même anévrisme après occlusion à l'aide de spires de platine, malheureusement suivie d'une récidive à 6 mois (flèche).

La principale cause de récidive est la recanalisation. La recanalisation peut se faire entre l'agent embolisant et la paroi anévrismale et parfois à l'intérieur de la masse de spires de platine.

Le platine est un matériau neutre, qui manque de thrombogénicité. À l'origine, le dispositif fut conçu pour provoquer une électro-thrombose de la lésion, et le courant devait du même coup réaliser l'électrolyse du point de jonction entre le guide poussoir et le filament de platine qui lui est apposé. On s'est rapidement rendu compte que l'on devait plutôt remplir la lésion avec le plus de platine possible. Malgré ces efforts, le volume de platine ou de spires ne correspond en général qu'à environ 10-30% du volume de l'anévrisme, si bien que le matériau qui remplit la lésion à la fin du traitement consiste surtout en thrombus. Ce thrombus sera par la suite sujet à la recanalisation, un mécanisme physiologique qui sera abordé plus en profondeur plus loin.

2.1.3. Rapports coûts-bénéfices des interventions endovasculaires

La comparaison du rapport coût-bénéfice des interventions endovasculaires vs chirurgicales a fait l'objet de quelques études (Forbes *et al.* 2002; Arko *et al.* 2002; Ballet *et al.* 2002). Du côté des anévrismes de l'aorte abdominale, le traitement endovasculaire s'est avéré plus dispendieux que le traitement chirurgical, principalement en terme de coût matériel. Une étude a rapporté que le coût moyen total différait de façon significative entre les 2 modes de traitement (endovasculaire = \$14967.63 versus chirurgical = \$6427.70 (Forbes *et al.* 2002). Cependant, la durée d'hospitalisation suivant le traitement des anévrismes aortiques abdominaux, qu'il s'agisse d'un traitement primaire ou secondaire, est inférieure pour les patients traités à l'aide de stent-grafts. De plus, le traitement endovasculaire, comparé à la chirurgie conventionnelle, réduit de moitié la morbidité à court et long terme (Arko *et al.* 2002). Le traitement endovasculaire des anévrismes de l'aorte abdominale continue donc d'être plus dispendieux que le traitement standard par chirurgie, mais cette technologie est encore au stade de développement et l'évolution rapide des techniques et dispositifs, ainsi que l'expérience acquise par les interventionnistes pourraient contribuer à une réduction des coûts associés au traitement endovasculaire. Plusieurs études qui ont tenté d'évaluer les coûts du traitement à l'aide de stent-grafts incluaient surtout des patients chez qui la chirurgie serait plus risquée, ce qui peut entraîner une surestimation de la morbidité et de la mortalité de cette procédure endovasculaire. Une étude clinique randomisée serait plus en mesure de déterminer la sécurité, l'efficacité, le coût du traitement à l'aide de stent-grafts comparé à la chirurgie et surtout, de déterminer si les patients traités à l'aide de stent-grafts recouvrent plus rapidement leur niveau de fonctionnement antérieur à l'intervention (Soulez *et al.* 2003).

Dans le cas du traitement des anévrismes intracrâniens, les résultats obtenus ont mis en évidence un coût similaire pour les 2 approches. Cependant, les coûts ne sont pas répartis de la même manière : par exemple, la réduction de la durée d'hospitalisation

chez les patients traités par voie endovasculaire permet en grande partie de compenser le coût élevé des dispositifs médicaux (Ballet *et al.* 2002). Comme dans le cas du traitement endovasculaire des anévrismes aortiques, la technologie, ainsi que l'expérience acquise par les intervenants, contribueront peut-être, dans l'avenir, à la réduction des coûts du traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens.

2.1.4. Problématiques liées aux méthodes endovasculaires de traitement des anévrismes

2.1.4.1. Généralités

La récurrence, ainsi que les problématiques associées à la livraison transcathéter, sont communes au traitement endovasculaire des anévrismes aortiques et des anévrismes intracrâniens.

Les techniques transcathéter exigent la miniaturisation des dispositifs. Les exigences techniques auxquelles nos matériaux et outils devront se conformer dépendent de l'application envisagée. Lors du traitement d'anévrismes par voie endovasculaire, l'agent ou dispositif embolisant doit être suffisamment petit pour être introduit dans des cathéters insérés par l'artère fémorale sans nécessiter de chirurgie (ce qui n'est pas actuellement le cas dans les stent-grafts). Défi encore plus grand encore; dans l'optique du traitement d'anévrismes cérébraux, l'agent ou dispositif embolisant doit pouvoir être inséré dans des microcathéters beaucoup plus petits (de l'ordre du millimètre).

Dans le cas où l'agent ou dispositif pourrait être comprimé pour retrouver sa taille et sa forme originale une fois placé dans l'anévrisme, ce retour à sa configuration originale doit être précis et fiable. Une déficience à ce niveau pourrait conduire à la récurrence, à l'échec du traitement ou même à la rupture et au décès.

L'agent ou dispositif embolisant devrait idéalement être moulé ou sculpté afin d'obtenir les formes complexes retrouvées au niveau du système vasculaire. Le matériau doit donc être suffisamment versatile pour se conformer à la variabilité de formes et de tailles que peuvent prendre les anévrismes.

Le coefficient de friction entre le cathéter et le dispositif doit aussi être minimisé, afin que celui-ci puisse glisser facilement à l'intérieur du cathéter et à travers les méandres vasculaires. Les dispositifs utilisés doivent être fixés ou bien coincés afin de ne pas migrer hors de l'anévrisme ou changer de position après le traitement. Ils doivent aussi pouvoir montrer une bonne résistance face à la pression sanguine pouvant causer la compaction du matériau, afin d'empêcher le sang d'entrer dans la poche anévrismale et de continuer à exercer une pression sur la paroi de l'anévrisme. Le matériau doit pouvoir être colonisé par les cellules afin de permettre une bonne incorporation tissulaire, ce qui favorise du même coup l'attachement à la paroi vasculaire, empêche la migration, freine la compaction, diminue le risque de thrombose de l'artère porteuse, diminue le risque d'embolies. En résumé, le dispositif devrait permettre la guérison définitive de la lésion.

Le traitement endovasculaire des anévrismes intracrâniens à l'aide de spires, et des anévrismes aortiques à l'aide de stent-grafts, conduit, trop souvent, à la récurrence. Dans les 2 cas, la présence de ces échecs est liée à plusieurs aspects pathologiques communs, du moins chez les modèles expérimentaux : 1) Persistance de flux résiduels anormaux, après traitement, au collet des anévrismes embolisés de façon incomplète (spires) ou au niveau de certaines fuites immédiates (stent-graft); 2) Apparition de canaux endothélialisés en forme de croissants à l'intérieur du caillot organisé se formant après traitement, entre l'implant ou la masse de spires et la paroi anévrismale; 3) Formation néointimale pauvre ou incomplète (Ribourtout *et al.* Sous Presse). L'aspect pathologique responsable de la perméabilité persistante des fuites péri-prothétiques lors du traitement à l'aide de stent-grafts et des lésions résiduelles et récurrences après embolisation à l'aide de spires peut être associé à la recanalisation (voir 2.2.3.4.). La coagulation,

l'inflammation, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML), avec la synthèse et le dépôt de matrice extracellulaire, sont responsables de l'intégrité du vaisseau et du phénomène de guérison vasculaire (Raymond, Desfaits et Roy, 1999). Le caillot, formé spontanément autour de l'agent embolisant ou autour du stent-graft après le traitement, agit comme matrice provisoire pour la migration cellulaire. La présence de caillot à l'intérieur et autour de l'agent embolisant sert de matrice résorbable sur laquelle les cellules musculaires lisses (CML) peuvent proliférer (Schwartz, Holmes et Topol, 1992). Cependant, les cellules endothéliales, qui maintiennent normalement la non-thrombogénicité de la paroi artérielle, entourent rapidement le caillot. La migration de ces cellules endothéliales est responsable de la formation de fentes de recanalisation et pourrait être impliquée dans les récurrences à long terme.

2.2. MÉCANISMES DE GUÉRISON DES LÉSIONS VASCULAIRES

La guérison après traitement endovasculaire des anévrismes, avec des spires de platine pour les lésions intracrâniennes et avec des stent-grafts pour les anévrismes aortiques abdominaux nécessite la croissance d'une couche néointimale épaisse qui incorpore complètement le stent ou scelle complètement le collet de l'anévrisme sacculaire. La guérison des anévrismes implique également le remplacement de la totalité (anévrisme sacciforme) ou d'une partie (anévrisme fusiforme) de la lumière de la lésion par un tissu conjonctif dense qui pourra par la suite se remodeler et se cicatriser progressivement.

Le phénomène de guérison suivant l'embolisation à l'aide de spires inclut la formation d'un thrombus, la migration de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ou de myofibroblastes et la production de composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène (Koivisto *et al.* 2000). On évoque également le rôle de cellules progénitrices circulantes quiensemencent le caillot et qui contribuent, par la repopulation du caillot par des cellules mésenchymateuses sécrétant du collagène, à la formation néointimale et au remplacement du caillot par du tissu conjonctif. La migration des cellules

endothéliales est aussi essentielle à la guérison après traitement d'anévrismes aortiques à l'aide de stent-grafts, afin de régénérer une surface endothélialisée non-thrombogène. En effet, dans les artères et veines normales, une monocouche de cellules, l'endothélium, forme une couche thromborésistante unique entre le sang circulant et les tissus subendothéliaux potentiellement thrombogènes (Szycher, 1983) (figure 2.13). Les cellules endothéliales jouent plusieurs rôles : elles synthétisent la prostaglandine PGI (prostacycline), un puissant antiplaquettaire ainsi qu'un activateur du plasminogène, qui solubilise la fibrine murale; elles possèdent une enzyme de surface capable de neutraliser l'adénosine diphosphate, ce qui réduit l'agglomération des plaquettes, et synthétisent aussi des substances anticoagulantes semblables à l'héparine (Szycher, 1983).

Nous allons revoir brièvement les différentes étapes qui conduiront à la guérison vasculaire, de l'adsorption des protéines plasmatiques jusqu'au retour à l'intégrité de la paroi.

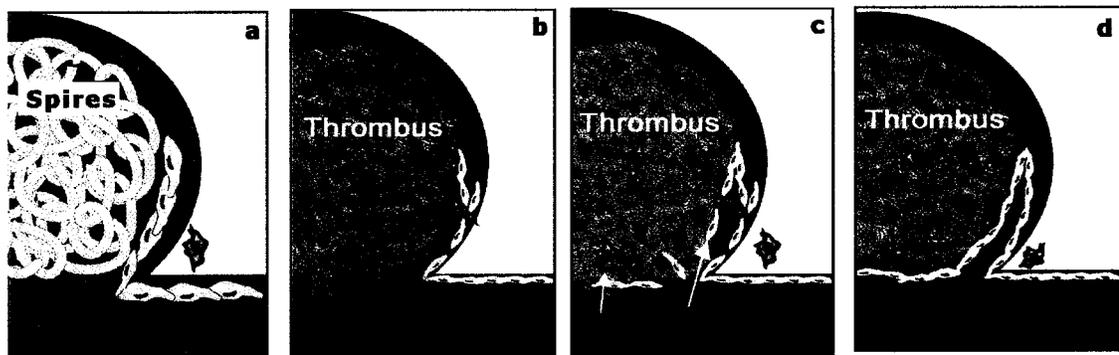


Figure 2.13. Guérison et recanalisation suite à l'occlusion anévrismale à l'aide de spires de platine : a) spires emplissant la cavité anévrismale, b) migration des cellules musculaires lisses vasculaires, c) migration des cellules endothéliales, d) formation d'une fente de recanalisation endothélialisée.

2.2.1. Généralités

L'environnement vasculaire auquel nos matériaux seront soumis est complexe et spécifique. Il dicte la plupart des caractéristiques qui feront des outils ou matériaux endovasculaires des solutions appropriées aux applications médicales envisagées.

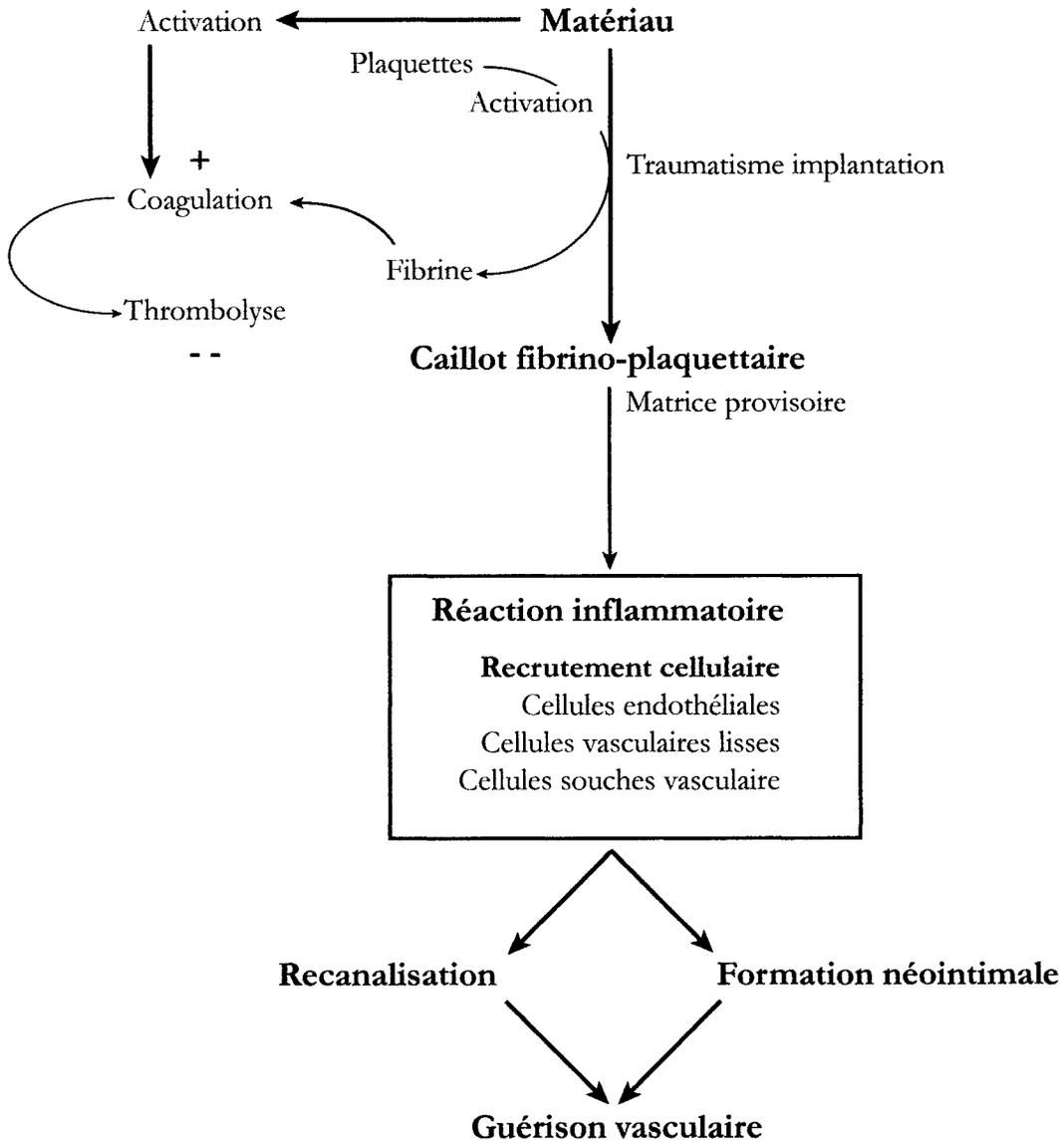
Par ailleurs, toute procédure chirurgicale initie une réponse du corps à la lésion. Ainsi, l'introduction d'un biomatériau dans l'environnement *in vivo* implique une injection, une insertion ou une implantation chirurgicale, qui s'apparentent à une lésion (Ratner, 1996). La procédure d'insertion initie une réponse du corps envers l'atteinte et des mécanismes sont activés afin de maintenir l'homéostasie. Le degré de perturbation des mécanismes homéostatiques, ainsi que les conditions pathophysiologiques créées et résolues constituent une mesure de la réaction de l'hôte au biomatériau et peuvent, de façon ultime, déterminer sa biocompatibilité (Ratner, 1996).

L'adsorption des protéines est connue comme étant la première étape de l'interaction sang/surface du biomatériau (Nemets et Sevastianov, 1991). Évidemment, la compatibilité des dispositifs médicaux avec le sang dépend aussi de plusieurs facteurs, comme le décompte des plaquettes sanguines, l'hématocrite, le fibrinogène, le collagène, etc. (Nemets et Sevastianov, 1991). Des processus aussi divers que la thrombose et l'hémostase, la guérison des tissus mous, l'infection et l'inflammation sont tous affectés par l'adsorption des protéines à la surface des biomatériaux (Chinn et Slack, 2000).

Les complications importantes engendrées par les dispositifs médicaux reposent largement sur les interactions biomatériaux/tissus, qui incluent tant les effets de l'implant sur les tissus de l'hôte, que les effets de l'hôte sur l'implant (Ratner, 1996).

Par souci de simplification, nous distinguerons tour à tour la thrombogénicité, la réaction inflammatoire, les phénomènes de guérison vasculaire et ses deux mécanismes essentiels, la formation néointimale et la recanalisation.

Tableau 2.1. Différentes étapes dans la guérison après l'introduction endovasculaire.



2.2.2. Thrombose

Les interactions entre le sang et la surface des biomatériaux engendrent la plupart du temps une adhésion des plaquettes et la cascade de la coagulation; c'est l'effet thrombogène. La compatibilité des biomatériaux avec le sang est un problème complexe.

Contrairement à la plupart des applications vasculaires des biomatériaux (pompes et valves cardiaques, vaisseaux artificiels, filtres, etc.), l'agent embolisant doit être suffisamment thrombogène pour causer l'occlusion de l'anévrisme ou de la partie du vaisseau à occlure. Il ne doit cependant pas être excessivement thrombogène, ce qui pourrait causer une réaction indésirable avec occlusion du vaisseau porteur ou des embolies en aval du site d'occlusion.

Dans le cas des anévrismes intracrâniens, la thrombose doit s'effectuer à l'intérieur de la poche anévrismale et au collet de l'anévrisme, mais sans toucher au vaisseau porteur ou à ses branches de bifurcation. Pour ce qui est des anévrismes aortiques, le thrombus doit se former entre le stent et la paroi anévrismale, mais sans occlure la lumière à l'intérieur de celui-ci.

La coagulation est constituée par les réactions d'une dizaine de protéines plasmatiques qui interagissent entre elles, ainsi qu'avec des surfaces procoagulantes à l'aide d'ions calciques. C'est un processus hémostatique très puissant. La coagulation produit la thrombine, enzyme pivot de l'hémostase. La coagulation est réglée et modulée de multiples façons. Elle est en balance constante avec des systèmes de régulation de la thrombolyse. La thrombose entraîne le clivage du fibrinogène en fibrine qui peut maintenant se polymériser, ainsi que le caillot de fibrine (Jobin, 1995). La thrombine conduit également à l'activation des plaquettes, si bien que les 2 systèmes (plaquettaire et fibrineux) sont inter-reliés.

Dans l'espace de quelques secondes suivant l'implantation d'un outil endovasculaire, l'exposition du sang à une surface étrangère mène à l'adsorption des protéines plasmatiques. Suivant cette adsorption, il peut y avoir déposition subséquente de plaquettes et leucocytes, menant à la coagulation du sang à la surface du biomatériau (Szycher, 1983).

Les protéines sont adsorbées à la surface du matériau durant la courte période de latence précédant l'adhésion des plaquettes et des cellules sanguines. Les ions inorganiques et les molécules d'eau sont adsorbés en premier, suivis des protéines du plasma. L'adsorption dépend des propriétés chimiques du matériau, de la durée du contact sang/matériau et de la surface de matériau exposée. De plus, l'adsorption des protéines est supérieure lorsque le flux est élevé (Cenni *et al.* 2000).

L'adhésion des plaquettes est favorisée par l'adsorption antérieure de γ -globuline ou de fibrinogène et est réduite par l'albumine. Lorsqu'une plaquette entre en contact avec une surface couverte de fibrinogène, elle passe d'une forme arrondie à une forme aplatie et se colle sur cette surface. Une réorganisation du cytosquelette s'ensuit. Le fibrinogène est en quelque sorte « absorbé » par la plaquette. Le relâchement des plaquettes et leur agrégation constituent l'événement final de cette phase de contact. L'activation des plaquettes est un pré-requis à la formation du complexe enzymatique de thrombose (Cenni *et al.* 2000). Les plaquettes agrégées relâchent entre autres des facteurs de coagulation.

La phase de contact inclut les réactions enzymatiques des phases initiales de l'interaction sang/matériau. Le facteur XII (facteur Hageman) se lie aux surfaces chargées négativement, en particulier aux groupes carboxyliques. Il peut aussi être activé par contact avec des plaquettes agrégées. Suivant l'adsorption, il se divise en fragments α -FXIIa et β -FXIIa. β -FXIIa convertit la prékallicroïne en kallicroïne, qui

elle, convertit le facteur XIIa en facteur de Hageman, lequel en retour induit une activation additionnelle de prékallicroïne en kallicroïne (Wise, 2000).

Le facteur XIIa active le facteur XI, lequel déclenche la voie intrinsèque de la coagulation. La voie extrinsèque est activée par le dommage tissulaire associé à l'implantation chirurgicale d'un dispositif. De plus, les monocytes activés par les matériaux artificiels relâchent des facteurs tissulaires et autres substances activant directement les facteurs X et II (Wise, 2000).

La phase de contact est très rapide et dépend de la réactivité de la surface, ainsi que du flux. De plus, sur des surfaces inertes, la présence de facteur XI en quantité infime mène à l'activation de la coagulation (Wise, 2000).

La coagulation sanguine résulte de la conversion du fibrinogène en fibrine. La fibrine qui se dépose sur les parois forme rapidement un réseau de fibrilles, la base du thrombus (Szycher, 1983). Comme nous l'avons mentionné, la formation d'un thrombus peut être précédée par l'adhésion des plaquettes. Au cours des dernières étapes de la coagulation sanguine sur une surface étrangère, il y aurait une interaction mutuelle et coopérative entre le processus de coagulation et l'agrégation plaquettaire. Pendant sa formation le thrombus piège d'autres éléments du sang : les globules rouges, qui jouent un rôle passif et n'ajoutent que de la matière et une coloration foncée caractéristique; les globules blancs qui, attirés par le thrombus, l'envahissent et s'y concentrent ; les leucocytes qui contribuent à la formation de la fibrine et au recrutement des plaquettes et, plus tard, à la thrombolyse (Szycher, 1983).

Suivant l'agrégation des plaquettes et le relâchement de facteurs de coagulation, un thrombus se développe rapidement, alors que la fibrine est polymérisée et que l'agrégation des plaquettes continue sa cascade. Le thrombus constitue la trame de fond pour la prochaine étape du mécanisme de guérison. Le caillot de fibrine fournit la

matrice initiale provisoire permettant la migration et l'invasion des cellules inflammatoires et des cellules réparatrices, alors que les plaquettes relâcheront des facteurs de croissance tels que le PDGF, le TGF- α et le TGF- β , qui sont des chimioattracteurs des cellules musculaires lisses, cellules inflammatoires et fibroblastes.

2.2.3. Réaction inflammatoire

L'inflammation est une réaction normale à la lésion cellulaire et à l'infection, permettant la défense, ainsi que la guérison subséquente (Odegard *et al.* 2000). Elle peut aussi être définie comme étant la réaction d'un tissu vascularisé à une atteinte locale (BME, 2003). L'inflammation sert à contenir, neutraliser, diluer ou supprimer un agent qui pourrait avoir des effets nocifs potentiels pour les tissus. Cependant, dans le cas d'un traitement impliquant l'implantation d'un biomatériau, elle ne doit pas aller jusqu'à engendrer le rejet du matériau ou une réaction indésirable, potentiellement nuisible à l'hôte et à l'efficacité du traitement. En effet, dans certains cas, si le mécanisme de réaction inflammatoire est incorrectement activé, il peut causer une thrombose non désirée, un saignement, un œdème et/ou une altération du fonctionnement de l'organe.

L'effet de la lésion et/ou du biomatériau *in situ* sur le plasma ou les cellules peut produire des facteurs chimiques qui servent de médiateurs à plusieurs des réponses vasculaires et cellulaires de l'inflammation (Ratner, 1996).

Dans le cas des biomatériaux, la réponse de l'hôte n'est pas reliée aux mécanismes communs de défense contre les organismes envahisseurs étrangers, mais ces mécanismes impliquent plusieurs composants et processus différents, qui peuvent interagir avec les biomatériaux et qui peuvent être impliqués dans sa réponse (BME, 2003).

Les événements se déroulant suite à l'atteinte, constituant le processus de guérison, sont la réponse inflammatoire aiguë, la réponse inflammatoire chronique, la réponse au corps étranger avec développement du tissu de granulation (macrophages, fibroblastes et formation des capillaires) et des cellules géantes, la réponse des macrophages et la fibrose. Ces événements constituent la base nécessaire à la compréhension de la réponse tissulaire à l'implantation d'organes artificiels, de dispositifs médicaux ou de biomatériaux (BME, 2003).

L'inflammation aiguë est de courte durée. Sa caractéristique principale est l'exsudation de fluide et de protéines plasmatiques, ainsi que la migration des leucocytes (majoritairement des neutrophiles). Suivant la localisation des leucocytes au site d'atteinte (implant), on observe la phagocytose et la libération d'enzymes, qui suivent l'activation des neutrophiles et des macrophages. Le rôle majeur des neutrophiles dans le processus inflammatoire aigu est la phagocytose des microorganismes et des corps étrangers (Ratner, 1996).

L'inflammation chronique est caractérisée par la présence de macrophages, de monocytes et de lymphocytes, avec prolifération de vaisseaux sanguins et de tissu conjonctif. Elle peut être causée par des stimuli inflammatoires persistants, les propriétés chimiques et physiques du biomatériau lui-même et par le mouvement du biomatériau au niveau du site d'implantation. Le macrophage constitue la cellule la plus importante dans l'inflammation chronique, en raison du grand nombre de produits biologiquement actifs qu'il peut produire, dont les facteurs de coagulation, de multiples enzymes protéolytiques et des facteurs de croissance (ex.: PDGF, VEGF et TGF- β) (Ratner, 1996).

La guérison est initiée par l'action des monocytes et des macrophages. Les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires du site d'implantation prolifèrent et commencent à former le tissu de granulation. Cette terminologie provient de la coloration rosée et de

l'aspect granuleux de la surface des lésions en voie de guérison et de leurs caractéristiques histologiques caractéristiques, incluant la prolifération de nouveaux petits vaisseaux sanguins et de fibroblastes (Ratner, 1996). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus connu sous le nom de néovascularisation ou angiogénèse. Ce processus implique la prolifération, la maturation et l'organisation des cellules endothéliales en tubes capillaires. Le tissu de granulation abrite aussi la prolifération de fibroblastes, qui sont actifs dans la synthèse du collagène et des protéoglycanes, ainsi que des cellules géantes, qui sont nées de la fusion des monocytes et macrophages dans le but de phagocyter le matériau (Ratner, 1996).

2.2.4. Formation néointimale et recanalisation

Le caillot qui se forme à la surface du matériau ou à l'intérieur de la cavité anévrismale sert de matrice provisoire à l'invasion cellulaire. Classiquement, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) sont impliquées dans la guérison de l'anévrisme, ainsi que dans l'hyperplasie intimale suivant la blessure de la paroi artérielle. La néointima, qui constitue une réponse vasculaire non-spécifique au traumatisme ou à l'introduction d'un corps étranger, est composée de cellules mésenchymateuses et de matrice extracellulaire recouvertes par une couche simple de cellules endothéliales (Raymond, Sauvageau, Salazkin *et al.* 2002). La néointima est essentielle à la guérison vasculaire.

Les plaquettes constituent une source riche en facteurs de croissance tels que le PDGF BB et le TGF β . Ces facteurs de croissance sont impliqués dans la migration et la prolifération des CML, aussi bien que dans la sécrétion de matrice extracellulaire, et peuvent donc promouvoir la formation néointimale et, du même coup, la guérison des anévrismes (Venne *et al.* 1999).

La migration des cellules endothéliales, essentielle au maintien de l'intégrité non-thrombogène de la paroi du vaisseau, se produit rapidement après traitement (Koivisto *et al.* 2000). Elle est associée à la recanalisation et à la récurrence des anévrismes intracrâniens (Raymond, Leblanc, Desfaits *et al.* 2002). Ce même phénomène peut finalement être observé au niveau des anévrismes abdominaux, où il peut entraîner la récurrence, par recanalisation et apparition de fuites péri-prothétiques.

Si l'ennemi principal des techniques de revascularisation comme la dilatation et l'implantation de stents est la resténose causée par une formation néointimale excessive, l'ennemi principal de l'embolisation est la recanalisation. Il s'agit ici, bien sûr, de concepts, puisque ni l'un ni l'autre de ces deux mécanismes n'est totalement indésirable et que tous deux sont importants dans les mécanismes physiologiques normaux responsables de l'intégrité vasculaire. La formation néointimale est essentielle à l'incorporation permanente du matériau. Elle est aussi essentielle à la reconstruction d'une paroi non-thrombogène et stable au niveau de l'implant (stent par exemple). En excès, elle conduit au rétrécissement de la lumière et même, à l'occlusion du vaisseau. La recanalisation est, elle, un effort physiologique naturel qui consiste à retrouver une lumière endothélialisée au site d'une occlusion par caillot. Ainsi, ces deux mécanismes entrent en branle dès l'insertion endovasculaire d'un corps étranger. À titre de mécanismes essentiels à la physiologie normale, nos efforts pour les contenir se heurtent à leur force et à leur persistance. Il faut donc plutôt viser une modulation de ces mécanismes.

Presque tous les agents embolisants sont sujets à la recanalisation. Ce phénomène est responsable d'échecs ou de récurrences après l'utilisation d'éponges, de particules, de polymères, de ballonnets largables et de spires de platine. La recanalisation est structurellement liée à l'invasion du caillot par les cellules endothéliales de l'intima de l'artère oblitérée (Raymond, Sauvageau, Salazkin *et al.* 2002) ou originaires de la différenciation de cellules souches circulantes, qui forment des canaux en

communication avec les flux résiduels à partir de l'artère normale porteuse de l'anévrisme ou de ses branches. Les mécanismes exacts de la recanalisation demeurent cependant inconnus. D'une façon un peu simpliste cependant, on peut affirmer que si l'occlusion thérapeutique n'implique qu'un minimum de caillot ou si l'agent embolisant occupe tout l'espace, la recanalisation n'aura qu'un effet minime sur l'évolution de la lésion. Ce concept est celui qui sera retenu pour la pertinence de l'utilisation du CHEM dans l'embolisation des anévrismes. On présume donc que si le polymère remplit toute la cavité anévrismale, la recanalisation du caillot ne pourra conduire à la récurrence.

2.3. GÉNÉRALITÉS SUR L'EMBOUSATION ENDOVASCULAIRE

Dans plusieurs maladies, comme l'artériosclérose, le but du traitement endovasculaire est la revascularisation (déboucher les artères). On utilise alors des techniques d'angioplastie ou l'insertion de stents.

Par opposition, l'embolisation endovasculaire est un traitement minimalement invasif, qui consiste en une occlusion thérapeutique d'une anomalie ou d'un vaisseau pathologique (ex. : vaisseaux, malformations artérioveineuses, anévrismes intra-aortiques, intracrâniens, etc.).

2.3.1. Caractéristiques idéales de l'agent embolisant

Un dispositif d'embolisation « idéal », conçu pour être déployé de manière percutanée et appropriée à l'occlusion endovasculaire chez des patients de tous âges, devrait inclure les caractéristiques suivantes : le dispositif devrait (i) pouvoir être glissé à l'intérieur d'un système de transport petit et souple (comme les cathéters), (ii) pouvoir être déployé dans l'un ou l'autre des systèmes artériel ou veineux, (iii) être facilement visible par fluoroscopie, (iv) être précis en termes de positionnement du dispositif, sans migration

potentielle, (v) être adaptable à des vaisseaux possédant des diamètres et longueurs variables, (vi) pouvoir être facilement repositionné avant le largage final, (vii) avoir un faible taux de recanalisation, et (viii) ne pas causer une réponse inflammatoire vasculaire significative (Salamat *et al.* 2002). Ce dernier point suscite une controverse puisque la réponse inflammatoire est essentielle au processus de guérison. Le matériau devrait donc, idéalement, engendrer une réaction inflammatoire minimale permettant la guérison.

Bien sûr, peu d'agents embolisants disponibles rencontrent ces critères. La plupart nécessitent des cathéters de gros calibre pour les acheminer, ou possèdent des systèmes de « livraison » compliqués, requérant des temps de fluoroscopie prolongés (Salamat *et al.* 2002).

Idéalement, les biomatériaux qui seront implantés en vue de servir de supports à la croissance cellulaire devraient posséder plusieurs propriétés leur permettant d'être utilisés comme substituts aux organes ou tissus. La biocompatibilité est la caractéristique la plus importante que doit avoir un biomatériau. En effet, les biomatériaux ne doivent pas engendrer une forte réponse immunitaire, ni un phénomène de cytotoxicité. De plus, ces matériaux doivent montrer des propriétés mécaniques correspondant à celles du tissu où ils seront implantés. La porosité est aussi très importante en raison du besoin d'apport de nutriments, d'échanges gazeux, ainsi que le besoin de croissance tri-dimensionnelle, croissance des cellules et du tissu à l'intérieur d'un support. Finalement, ces matériaux doivent avoir une chimie de surface appropriée afin de permettre un bon attachement cellulaire, une prolifération cellulaire et une différenciation cellulaire. Ils doivent aussi être faciles à stériliser (Salgado *et al.* 2002).

2.3.2. Biomécanique

Certains aspects biomécaniques sont impliqués dans la formation anévrismale, en combinaison ou non avec des facteurs héréditaires et acquis. Les anévrismes pourraient en effet se développer naturellement au niveau de zones vulnérables, après plusieurs années d'assauts répétés des variations de la pression sanguine, avec en moyenne 100000 ondes de pression se propageant dans les artères à chaque jour. Les bifurcations artérielles sont des zones particulièrement vulnérables.

Une onde qui se propage dans un tube est partiellement réfléchi au niveau des embranchements ou des points de bifurcation. Prenons l'exemple de l'aorte. La nature et l'amplitude de l'onde réfléchi par la bifurcation aortique dépendent du rapport entre la surface de la section des deux artères iliaques et celle de l'aorte. Ce rapport diminue progressivement avec l'âge, l'aorte devenant de plus en plus flasque; plus le rapport devient faible et plus l'onde réfléchi dans l'aorte est importante. Ainsi, toute dilatation initiale de l'aorte (causée soit par une pathologie ou par l'âge) réduit ce rapport des surfaces et augmente donc l'importance de l'onde réfléchi, ainsi que la contrainte qu'elle provoque sur les parois artérielles (Johansen, 1983).

Des phénomènes de « coup de bélier » se produisent lorsque l'onde réfléchi entre en collision avec l'onde systolique provoquée par le battement cardiaque suivant, entraînant une tension supplémentaire sur la paroi artérielle. De plus, lorsque le calibre d'un tube varie progressivement (comme lorsqu'un anévrisme apparaît), le fluide qui se trouve au voisinage des parois est freiné et son écoulement devient turbulent, cette turbulence peut alors faire vibrer les parois. L'importance de ces deux phénomènes peut être confirmée par le fait que les anévrismes se forment le plus souvent en amont des bifurcations ou à l'origine des artères de l'embranchement suivant une bifurcation (Johansen, 1983).

Les dispositifs utilisés pour traiter les anévrismes par voie endovasculaire devront donc avoir des propriétés mécaniques proches de celles des vaisseaux sains, afin de ne pas créer de bris dans l'uniformité et la continuité de la paroi vasculaire, et ainsi éventuellement causer l'apparition de zones de recirculation pouvant favoriser la création de nouveaux anévrismes. Ils devront idéalement engendrer un phénomène de réparation le plus proche possible de la nature. Ces dispositifs devront du même coup pouvoir résister aux assauts répétés du flux sanguin afin de réduire les risques de migration, compaction ou de déplacement qui pourraient nuire à la réussite du traitement.

2.3.3. Biocompatibilité

La notion de biocompatibilité est essentielle dans le domaine des biomatériaux. Classiquement, la notion de biocompatibilité était en quelque sorte « négative ». Elle était définie par des propriétés selon lesquelles le matériau ne devait pas avoir : de réaction inflammatoire, de toxicité, d'effet thrombogène, etc (Sedel et Janot, 2003). En fait, le matériau biocompatible devait être neutre, inerte et n'engendrer qu'un minimum de réactions biologiques. La notion de biocompatibilité est aujourd'hui élargie. Elle est maintenant définie comme étant la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique (Williams, Black et Doherty, 1992). Cette définition implique que le matériau implanté dans le corps ne sera pas inerte et interagira donc avec les tissus de façon dynamique. Cette notion de biocompatibilité « élargie » amène donc la notion de « bioactivité », qui implique que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais qui, au contraire, fasse réagir le tissu vivant (Sedel et Janot, 2003).

L'ancienne notion de biocompatibilité, impliquant une inertie, peut s'appliquer dans certains domaines, comme dans le cas de prothèses vasculaires ou de stents, qui doivent

demeurer perméable. Ici, l'absence de réaction donne une impression de sécurité quant à la formation de tissu réactionnel qui pourrait engendrer un rétrécissement de la lumière (resténose et occlusion). L'absence de réaction inflammatoire chronique est aussi rassurante dans ce contexte. Même ici, on a de nos jours souvent fait appel à une notion de bioactivité, comme utilisée dans les stents libérant une drogue (Sirolimus par exemple). Au contraire, au niveau du traitement des anévrismes sacculaires par exemple, la guérison nécessite une interaction entre le matériau et les tissus. Notamment, avec l'implantation de polymères, la réaction tissulaire locale consiste en une thrombose et une réaction inflammatoire, laquelle initie la réparation cellulaire et des processus de régénération sont alors observés (Saad *et al.* 1999).

La réponse biologique à un matériau est dépendante de trois facteurs : la composition/structure du matériau, les caractéristiques du site hôte et les demandes fonctionnelles envers le matériau (MCG, 1999). La réponse cellulaire sera, en effet, fonction de la composition et de l'état de surface du matériau, mais aussi de la nature de l'environnement biologique, des contraintes mécaniques exercées par le matériau sur son environnement biologique, ainsi que des contraintes exercées par l'environnement sur le matériau. Par conséquent, un matériau ne peut être caractérisé comme biocompatible ou non-biocompatible avant que son site hôte et sa fonction ne soient définis.

Des tests *in vitro* et *in vivo* doivent être effectués afin de déterminer la biocompatibilité d'un matériau dans un site spécifique. Une évaluation *in vitro* peut fournir, rapidement et avec peu de frais, des données sur les interactions biologiques. Si le test *in vitro* permet d'anticiper ce qui se passera réellement dans l'environnement *in vivo*, beaucoup plus complexe, il minimise alors l'utilisation d'animaux en recherche. Cependant, les résultats des tests *in vitro* pourraient ne pas bien représenter la situation relative aux implants.

Une estimation de la biocompatibilité peut être obtenue *in vitro* à l'aide de tests de cytotoxicité et de mutagénicité. Le terme cytotoxicité signifie causer des effets toxiques (mort cellulaire, altération de la perméabilité cellulaire, inhibition enzymatique, etc.) au niveau cellulaire, alors que le terme mutagénicité fait référence à l'étude des propriétés mutagènes. Ces tests ont été imaginés afin de prédire le potentiel de réaction indésirable telles que la toxicité et la cancérogénicité, afin de faire une pré-évaluation des substances sans avoir à observer ces effets chez les êtres vivants eux-même. D'autres tests peuvent être effectués pour évaluer la biocompatibilité d'un biomatériau, comme des tests d'hémolyse, de thrombogénicité, de pyrogénicité, de toxicité systémique, d'injections intracutanées, de sensibilisation de la peau, d'implantation intramusculaire et d'implantation osseuse (CSA, 1984 ; ASTM, 1998).

Les animaux sont utilisés dans l'évaluation des biomatériaux afin de créer un modèle d'environnement précis qui peut être retrouvé chez l'homme. Cependant, il y a un large éventail d'anatomies, de réactions physiologiques ou pathologiques chez l'animal et on ne peut pas toujours présumer que le modèle animal prédira le comportement réel d'un dispositif chez l'humain.

Les études pré-cliniques *in vivo* permettent de diminuer les risques d'échecs et de complications lors de l'introduction en étude clinique humaine, mais ne peuvent en aucun cas les remplacer. On doit tout d'abord choisir le modèle animal offrant le meilleur parallèle anatomique ou biochimique de la situation observée chez l'homme. Bien sûr, les expériences doivent être élaborées afin de minimiser le nombre d'animaux nécessaires. On ne doit pas non plus perdre de vue que, plus le système est complexe (ex. un humain versus des cellules en culture), plus la variabilité est grande.

2.4. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR TESTER LES AGENTS OCCLUSIFS

La conception, l'amélioration et l'évaluation des matériaux endovasculaires nécessitent l'utilisation de modèles variés. Chacun de ces modèles a un rôle spécifique. À une extrémité, les modèles théoriques mathématiques sont utiles pour la modélisation des effets de modification du flux sanguin sur les forces physiques pouvant être liées à la croissance et la rupture des anévrismes. Par ailleurs les modèles *in vitro* sont essentiels lors de l'évaluation initiale de la miniaturisation et de la navigabilité des outils endovasculaires. Des modèles *in vitro* sont également utiles pour déterminer, lors d'une première étape, la cytotoxicité et la mutagénicité ou les effets biologiques des substances additives ou constitutives envisagées pour construire ou modifier l'agent embolisant. Il existe aussi des méthodes *in vitro* et *in vivo* conçues pour étudier la thrombogénicité des matériaux. À l'autre extrémité, des modèles *in vivo* complexes sur de gros animaux permettent l'évaluation préclinique de l'outil endovasculaire dans sa forme finale, celle qui sera utilisée en clinique. Nous reverrons plus particulièrement ici les modèles utiles aux agents embolisants visant le traitement des anévrismes.

2.4.1. Modèles *in vitro*

Bien que des études à long terme effectuées sur des modèles animaux soient nécessaires afin d'élucider complètement les effets biologiques et les limites pratiques de tout dispositif biomédical, le développement d'agents embolisants bioactifs peut être accéléré par des tests *in vitro*. Ceux-ci fournissent rapidement des informations sur les interactions cellules/dispositif et peuvent servir à évaluer simultanément un grand nombre de biomatériaux potentiellement utiles à l'application envisagée (Abruzzo *et al.* 2002).

Des études *in vitro* très simples nous ont permis les études préliminaires servant à mesurer la libération de facteurs de croissance par un agent embolisant (Annexe 1) (Raymond, Metcalfe, Desfaits *et al.* 2003) ou le temps de dissolution du poloxamère (Annexe 2). Ces mesures peuvent se faire rapidement et à coût modique, mais ne permettent pas toujours d'anticiper la situation *in vivo*, comme nous le verrons avec le poloxamère (Raymond, Metcalfe, Salazkin *et al.* Sous presse, *Biomaterials*, Annexe 2).

2.4.1.1. Modèles hémodynamiques

Des montages *in vitro* permettent une simulation des conditions hémodynamiques rencontrées dans les systèmes biologiques. Par exemple, ils peuvent servir à l'étude des flux ou à des pratiques d'interventions transcathéter. Ces modèles vasculaires consistent parfois en une perfusion pulsatile de solution aqueuse dans des modèles faits de silicone (Gobin *et al.* 1994; Gruber *et al.* 1997). Des modèles *in vitro* des principales artères cérébrales humaines ont également été développés, par moulage des artères d'un spécimen humain. Ici, des anévrismes peuvent être simulés et ajoutés au moulage (Gailloud *et al.* 1997). Des connecteurs permettant le branchement d'une pompe donnant un flux pulsatile à l'intérieur de la lumière du modèle ont aussi été ajoutés. En plus de servir à l'étude des flux et des interventions, ces modèles peuvent également être utilisés à l'évaluation des nouvelles méthodes d'imagerie, telles que la résonance magnétique.

2.4.2. Modèles animaux

2.4.2.1. Généralités

Certains modèles animaux sont trop petits pour l'évaluation de dispositifs d'embolisation. Cependant, ces modèles sont utiles aux recherches portant sur les réactions biologiques, comme les souris transgéniques ou immunodéficientes, car ils permettent l'utilisation d'une grande variété d'outils d'investigation. Par exemple, un modèle d'occlusion de l'artère carotide a été développé chez la souris (Kumar et Linder, 1997). À l'inverse, les gros animaux sont utiles à l'évaluation préclinique des dispositifs médicaux, mais les outils d'investigation disponibles en biologie moléculaire sont limités.

Il est possible d'étudier les mécanismes de la formation anévrismale *in vivo*. Des anévrismes sacculaires cérébraux peuvent être induits avec succès par ligature de l'artère carotide commune, hypertension expérimentale et diète bêta-aminopropionitrilée. De tels anévrismes ont été induits avec succès chez le singe (Hashimoto *et al.* 1987; Kim *et al.* 1989), le rat (Nagata *et al.* 1980; Coutard, Huang et Osborne-Pellegrin, 2000) et la souris (Morimoto *et al.* 2002). L'utilisation d'une diète bêta-aminopropionitrilée peut contribuer à affaiblir la paroi artérielle, augmentant ainsi l'incidence de développement anévrismal. La capacité d'induire la formation d'anévrismes est fortement liée au stress hémodynamique. Ces anévrismes sont localisés au niveau des artères principales à la base du cerveau. Quelques-uns de ceux-ci prennent naissance à l'apex d'une bifurcation. Les observations macroscopiques et microscopiques sont généralement en accord avec les observations faites sur les anévrismes spontanés humains (Hashimoto *et al.* 1984).

D'autres modèles animaux sont des lésions chirurgicales. Contrairement aux modèles précédents, il ne s'agit pas ici d'élucider la pathologie de la formation anévriasmale, mais d'évaluer les mécanismes de guérison qui suivent l'implantation du matériau. Ils sont largement utilisés pour évaluer les développements dans le traitement endovasculaire des anévrismes.

Ces modèles d'anévrismes, constitués de poches veineuses apposées à l'artère carotide, ont été grandement utilisés au cours d'études expérimentales sur les mécanismes de guérison suivant l'embolisation d'anévrismes (Byrne *et al.* 1997; Graves, Strother et Rappe, 1993; Mawad *et al.* 1995; Reul *et al.* 1997; Murayama *et al.* 1997; Tenjin *et al.* 1995). Ce sont ces types d'anévrismes que nous avons utilisé chez le chien (Metcalf, Desfaits, Salazkin *et al.* 2003; Raymond, Metcalfe, Desfaits *et al.* 2003).

2.4.3. Avantages et inconvénients des modèles animaux

L'évaluation préclinique des dispositifs et des matériaux médicaux nécessite l'utilisation de modèles animaux d'anévrismes qui simulent le comportement des anévrismes intracrâniens chez l'humain. Le modèle animal idéal devrait : (a) démontrer une perméabilité à long terme chez les spécimens contrôle non-traités; (b) être construit chez une espèce ayant un système de coagulation similaire à celui des humains; (c) simuler la morphologie d'un anévrisme de bifurcation, soumettant le collet anévrismal à de fortes contraintes de cisaillement; (d) être construit dans des vaisseaux ayant une taille similaire aux vaisseaux chez l'humain; (e) être construit sans chirurgie locale afin de minimiser les artéfacts, qui pourraient masquer l'effet de l'expérimentation visant à augmenter l'activité biologique du dispositif ou du matériau implanté; (f) simuler les limites rencontrées lors de l'embolisation d'anévrismes humains telles que la compaction des spires et la croissance du collet (Kallmes *et al.* 1999). Pour être utile, le modèle doit reproduire la problématique clinique pour laquelle le dispositif ou le

matériau a été développé. Par exemple, la thrombose et la réaction néointimale excessive que l'on retrouve typiquement dans les modèles artériels porcins en font des modèles utiles à l'étude de la resténose après dilatation ou la mise en place de stents. Ces mêmes caractéristiques font du porc un mauvais sujet pour les études sur le traitement endovasculaire des anévrismes puisque ces lésions seront aisément guéries chez cet animal quel que soit l'agent embolisant. À l'inverse, les modèles canins qui sont moins susceptibles de répondre par une formation néointimale excessive sont moins utilisés pour étudier la resténose, mais représentent des modèles de choix pour étudier l'utilité des agents emboliques ou des stent-grafts dans la pathologie anévrismale, les fuites péri-prothétiques ou la recanalisation après embolisation.

Les lapins ont aussi déjà été utilisés pour la création chirurgicale de modèles d'anévrismes. Une perméabilité à long terme n'a été montrée que chez un petit nombre de ces anévrismes de bifurcation faits de poches veineuses. De plus, chez le lapin, la procédure chirurgicale engendre des taux de mortalité élevés et il y a parfois occlusion accidentelle de l'artère parente (Kallmes *et al.* 1999).

L'équipe de Kallmes et d'autres chercheurs mentionnent que les anévrismes latéraux canins embolisés à l'aide de GDC démontrent une fibrose extensive et la formation de nouveaux vaisseaux autour de la masse de spires, même lorsque l'embolisation est retardée et faite plus de 1 mois après la création des anévrismes. La présence d'une paroi veineuse plutôt qu'artérielle, ainsi que la présence de matériel de suture au niveau de l'anévrisme ont un effet méconnu sur le milieu biologique de l'anévrisme (Kallmes *et al.* 1999; Mawad *et al.* 1995). Selon ces affirmations, ces modèles auraient une utilité limitée dans l'évaluation des modifications sur les GDC (fibres de collagène, enrobage de collagène, implantations d'ions, etc.), puisque l'utilisation de spires nues engendre déjà la fibrose des anévrismes (Kallmes *et al.* 1999).

Certains chercheurs affirment donc qu'un modèle de formation anévrismale obtenu grâce à une perfusion d'élastase serait mieux adapté à l'évaluation de petits dispositifs endovasculaires (Kallmes *et al.* 1999). Ce type d'anévrisme peut être créé chez le lapin. Brièvement, l'artère carotide est exposée et ligaturée dans sa portion distale. L'élastase est injectée sous la protection d'un ballonnet gonflable qui empêche la circulation (Kallmes et Fujiwara, 2002; Altes *et al.* 2000). Ces anévrismes, constitués d'une paroi artérielle affaiblie, plutôt que d'une poche veineuse, seraient plus propices à simuler les anévrismes humains. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la création d'un anévrisme à l'aide d'élastase se fait par l'altération de la lame élastique de l'artère, ce qui affaiblit la paroi et crée un anévrisme sous l'effet du flux sanguin. Par contre, contrairement aux anévrismes chirurgicaux, dont les caractéristiques spécifiques peuvent être reproduites à volonté, les anévrismes induits à l'aide d'élastase, ainsi que leurs collets, sont de tailles et de formes diverses, ce qui entraîne une variation dans les résultats obtenus avec les agents emboliques à évaluer (Kallmes *et al.* 2002). De plus, l'élastase a parfois pour effet de causer la dilatation de l'artère porteuse adjacente à l'anévrisme, engendrant un élargissement marqué du collet de l'anévrisme et allant même jusqu'à empêcher l'embolisation intrasacculaire à l'aide de spires (Kallmes *et al.* 2002).

Certains aspects hémodynamiques des modèles *in vivo* sont également importants à considérer. Les anévrismes latéraux ne sont pas soumis aux mêmes flux et contraintes de cisaillement (« shear stress »), qui y sont habituellement réduits par rapport à ceux subits par les anévrismes de bifurcation. Les anévrismes ont une forte propension à se former à l'apex d'une bifurcation (figure 2.14). En effet, le stress à l'apex est de 9 à 14 fois supérieur que le long des segments droits d'une artère (Hademenos, 1997). De plus, on retrouve plus de récurrence avec les modèles animaux de bifurcation qu'avec les modèles d'anévrismes latéraux (Raymond, Berthelet, Desfaits *et al.* 2002). Cependant, le modèle latéral nécessite une chirurgie moins longue et difficile que l'anévrisme de bifurcation. Chaque animal présente 2 lésions permettant de comparer l'effet du traitement à son

contrôle dans les mêmes conditions biologiques. Nous avons donc choisi, pour les études préliminaires sur le CHEM, un modèle d'anévrismes latéraux canins, que nous avons étudié de façon extensive dans notre laboratoire (Raymond, Desfaits et Roy, 1999; Raymond, Berthelet, Desfaits *et al.* 2002; Raymond, Sauvageau, Salazkin *et al.* 2002; Metcalfe *et al.* 2003; Raymond, Metcalfe, Desfaits *et al.* 2003; Raymond, Leblanc, Morel *et al.* 2003). Ce modèle présente des récurrences même à 3 semaines, au moins avec l'utilisation d'éponges de collagène (Gelfoam®) (Raymond, Desfaits et Roy, 1999).

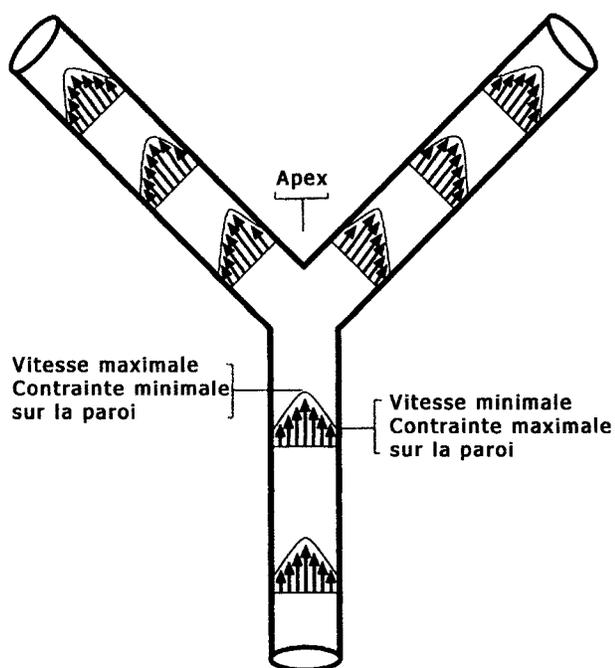


Figure 2.14. Forces hémodynamiques exercées sur la paroi vasculaire à une bifurcation. Le sang passe de l'artère parente aux artères secondaires, dont l'aire de leurs sections transversales combinées est généralement inférieure en surface à celle de l'artère parente. Le flux sanguin est donc ralenti. L'énergie cinétique et le momentum du sang en excès sont donc dissipés à l'apex, endommageant les tissus et favorisant la turbulence. Le profil de vitesse est aussi représenté. La longueur des flèches est proportionnelle à la vitesse. Les vitesses les plus élevées se rencontrent dans la région de l'apex, où on observe un stress hémodynamique maximal (Tiré de Hademenos et Massoud, 1997).

2.5. LES POLYMÈRES

La vie, en son essence, est polymérique. En effet, les constituants les plus importants des cellules vivantes (protéines, hydrates de carbone et acides nucléiques) sont tous des polymères (Galaev et Mattiasson, 1999).

Les polymères, naturels et synthétiques, forment une classe prometteuse de matériaux capables de rencontrer les besoins spécifiques de nombreuses applications biomédicales. Ils peuvent être sélectionnés pour leur résistance mécanique, leur dégradation plus ou moins rapide ou complète, leur solubilité variable ou leur perméabilité, selon les propriétés recherchées. Leurs propriétés de corps et de surface peuvent être modifiées, à volonté. Le design des macromolécules doit, en effet, être soigneusement ajusté afin d'offrir la bonne combinaison de fonctions chimiques, mécaniques et biologiques. Dans cette optique, des techniques de microarchitecture ont été mises au point afin d'obtenir des matériaux ayant la configuration désirée au niveau de la taille des pores, de la disposition spatiale des pores au niveau de l'échantillon, de l'interconnexion ou non des pores, du pourcentage de porosité, etc. (Nakayama et Matsuda, 1995; Zeltinger *et al.* 2001).

Les polymères (ou macromolécules) sont une répétition d'un ou plusieurs types de motifs (unités) appelés monomères. Le squelette du polymère est stabilisé par des liaisons chimiques covalentes, il ne se dissout donc pas en solution. La cohésion entre les macromolécules est assurée par des liaisons physiques (Van der Waals ou hydrogène), lesquelles se rompent si on chauffe le matériau au-dessus d'une température donnée. On peut classer les polymères en trois grandes catégories, selon leurs propriétés thermiques et leur mode de transformation : les thermoplastiques, qui se ramollissent de façon réversible sous l'effet de la température mais sans que leur transformation ne s'accompagne d'aucune réaction chimique; les thermodurcissables, qui durcissent de façon irréversible sous l'effet de la température, combiné ou non à celui d'un catalyseur

ou d'un durcisseur; les élastomères, qui s'apparentent aux thermoplastiques par leur structure initiale et aux thermodurcissables pour leur mode de transformation (ce sont des homopolymères ou des copolymères).

2.6. LE CHEM

2.6.1. Mise en situation

Le CHEM a été élaboré par Sokolowski *et al.* au 'Mitsubishi Heavy Industry and Jet Propulsion Laboratory' à Pasadena, en Californie. Un potentiel pour l'utilisation médicale lui a été rapidement attribué. Au départ, il était destiné à des applications aérospatiales, ainsi que terrestres, comme des roues, hangars, antennes, tentes, etc. (Sokolowski et Chmielewski, 1999). Le concept de roues a d'ailleurs été testé pour de petits véhicules d'exploration planétaire robotisés et pourrait aussi être appliqué à la fabrication commerciale de jouets (Chmielewski, Sokolowski et Rand, 2003).

2.6.2. Composition

Le CHEM est un thermoplastique fait à base de polyuréthane. Les polyuréthanes (PU) forment le groupe le plus polyvalent parmi tous les groupes de polymères. Les polyuréthanes peuvent présenter un nombre presque infini de variations dans leur composition chimique, leur structure, ainsi que dans leurs applications. Les PU doivent leur nom aux liaisons uréthane qu'ils portent dans leur chaîne principale. Ils sont généralement obtenus par les réactions des polyisocyanates avec les composés polyhydroxy (Hasirci, 1991). Il est possible de contrôler les propriétés mécaniques des polyuréthanes en utilisant des composants de structure chimique différente à des rapports molaires appropriés (Hasirci, 1991).

Les PU ont été découverts en 1937 et ont trouvé, depuis, de nombreuses applications, entre autres dans la fabrication d'éponges, d'adhésifs, de recouvrements, de fibres, de résines et d'élastomères. Les PU ont de nombreuses applications biomédicales. Ce sont les polymères les plus largement utilisés dans la fabrication de produits et dispositifs qui seront en contact direct avec le sang (Hasirci, 1991). Ils constituent un matériau de choix pour les dispositifs d'assistance ventriculaire et pompes sanguines, dû en partie à leur flexibilité et résistance (Hanson, 1998). De plus, le polyuréthane a été utilisé *in vitro* comme support pour la croissance de cellules (Saad *et al.* 1999; Yamashita *et al.* 2001), ainsi que comme véhicule pour le transfert *in vivo* de cellules implantées (Wright *et al.* 1998).

Les mousses ou éponges de polyuréthane sont obtenues par la formation de bulles de gaz, obtenues à l'aide d'un agent gonflant dans le mélange polymérisant. Cet agent est habituellement le dioxyde de carbone (réaction de l'eau avec l'isocyanate) dans le cas d'éponges flexibles. Pour les éponges rigides, on peut utiliser, entre autres, les hydrochlorofluorocarbones (HCFC), les hydrofluorocarbones (HFC) ou les dérivés du pentane.

Le CHEM est constitué de diisocyanate (isocyanate est le nom générique des sels et esters de formule $C_6H_5-N=C=O$) et de polyol (possédant plusieurs fois la fonction alcool) (figure 2.15). Il prend la forme d'une éponge (figure 2.16). L'avantage de former des PMF sous la forme d'une éponge est qu'ils constituent un matériau à mémoire de forme tridimensionnelle au lieu de la forme à un seul axe retrouvée communément avec les AMF (alliages à mémoire de forme) (Monkman, 2000).

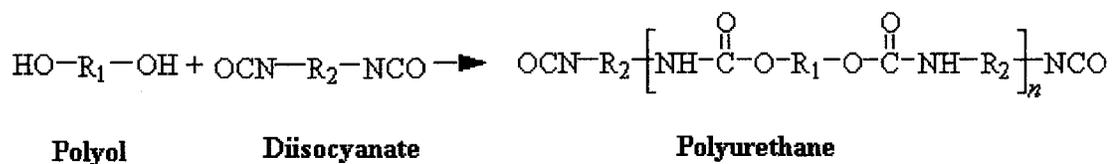


Figure 2.15. Réaction chimique de base permettant la préparation des polyuréthanes.

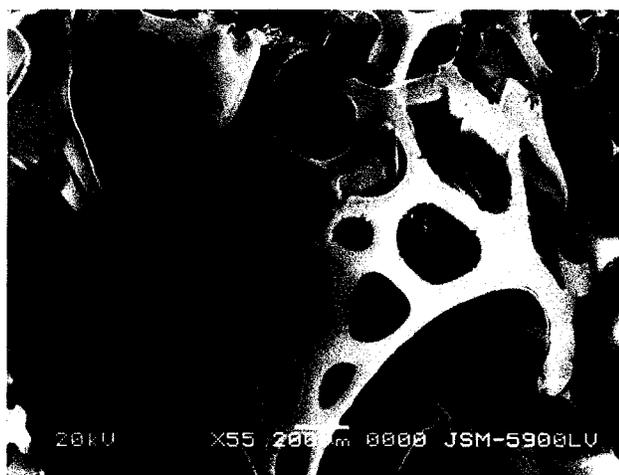


Figure 2.16. Photographie du CHEM prise à l'aide d'un microscope électronique à balayage.

Des tests thermomécaniques ont montré que le CHEM est plus friable et plus rigide en tension qu'en compression. La résistance à la compression et le module de Young du CHEM sont largement inférieurs au-dessus de la T_g , par rapport à sous la T_g . Après un cycle de compression, refroidissement et re-chauffage, le CHEM retrouve totalement sa forme initiale, sans déformation résiduelle. L'énergie maximale relâchée lors du recouvrement de la forme originale est inférieure à celle utilisée pour la compression; le CHEM ne risque donc pas d'exercer une pression sur les parois de l'anévrisme et de

causer sa rupture, mais il pourrait ne pas résister aux assauts du flux sanguin dans certaines bifurcations. Sous des cycles de compression/expansion répétés les propriétés du CHEM ne varient que légèrement, le CHEM perdant un peu de sa rigidité (Watt, Pellegrino et Sokolowski, Sous Presse).

2.6.3. Mémoire de forme du CHEM

Les biopolymères répondent aux stimuli externes de façon tout-ou-rien ou, du moins, de manière non-linéaire. Ces observations ont mené à la synthèse de polymères fonctionnels synthétiques, qui répondent à un changement de température, de pH, de champ magnétique ou électrique, ou à tout autre paramètre, et ce, de manière contrôlée.

Les polymères à mémoire de forme ont la capacité de mémoriser une forme, permanente, pouvant différer, de façon substantielle, de leur forme initiale, temporaire. Des dispositifs gros et encombrants pourraient donc potentiellement être introduits à l'intérieur du corps sous une forme temporaire qui serait comprimée, et ce à l'aide de techniques minimalement invasives, et ensuite, être déployés sur demande pour atteindre leur forme permanente correspondant aux besoins (Lendlein et Langer, 2002).

Les AMF comptent sur la déformation plastique causée à une température ambiante donnée, qui devient ensuite élastique en chauffant, permettant à l'alliage un retour élastique vers leur forme originale. Malgré la transformation de plastique à élastique, une augmentation du module d'élasticité est normalement observée avec l'augmentation de la température (Monkman, 2000). D'un autre côté, les PMF comptent sur une ou plusieurs T_g pour qu'un changement d'état s'effectue et, contrairement à leurs équivalents métalliques, les PMF montrent une réduction du module d'élasticité avec l'augmentation de la température (Monkman, 2000).

L'effet de mémoire de forme induit thermiquement a été décrit pour diverses classes de matériaux : les polymères, tel que les polyuréthanes, poly(styrène-*block*-butadiène) et polynorbornène; les hydrogels; les alliages métalliques; et les céramiques (Lendlein et Langer, 2002).

Pour les alliages métalliques, l'effet de mémoire de forme est dû à une transition de phase martensitique (Lendlein et Langer, 2002). La transformation martensitique n'implique pas de migration atomique et les atomes sont réarrangés de façon coopérative ou décalés afin de former une nouvelle structure cristalline (Shape Change Technologies, 2003). De façon différente, les polymères élaborés pour montrer une mémoire de forme induite thermiquement requièrent deux composantes au niveau moléculaire: une réticulation déterminant la forme permanente et des « segments interchangeables » avec la T_{trans} afin de fixer la forme temporaire. Au-dessus de la T_{trans} , la forme permanente peut être déformée par l'application d'un stress externe. Après refroidissement au-dessous de la T_{trans} et le relâchement subséquent du stress externe, la forme temporaire est obtenue. L'échantillon retrouve sa forme permanente lorsque chauffé à $T > T_{\text{trans}}$ (Lendlein et Langer, 2002) (figure 2.17).

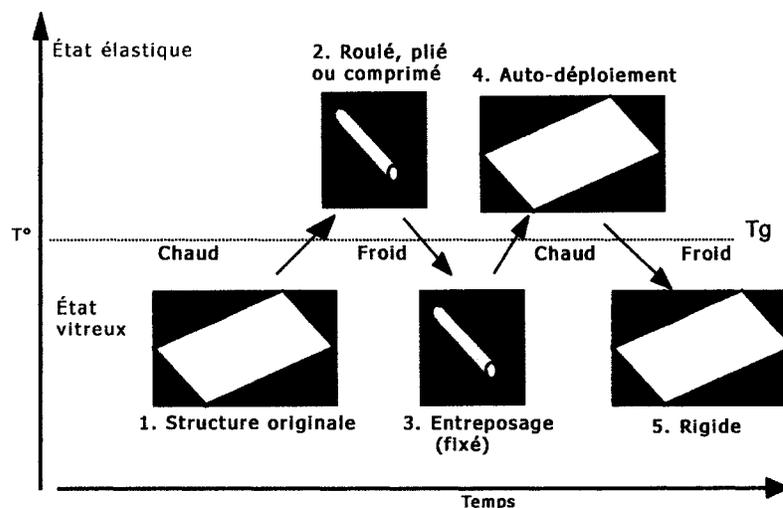


Figure 2.17. Cycle de transformation du CHEM. Le CHEM est à son état élastique lorsque la température est au-dessus de sa T_g (température de transition vitreuse), on peut alors le comprimer en un très petit volume. Lorsque la température descend sous sa T_g (état rigide), le CHEM garde cette forme compressée. Il reprend sa forme originale si la température remonte au-dessus de sa T_g (Sokolowski et Hayashi, 2003).

Le CHEM est donc une mousse à mémoire de forme dont on peut choisir la température de transition vitreuse (T_g). Au-dessus de la T_g le CHEM est souple et modelable, mais à mesure que la température tombe sous sa T_g sa rigidité augmente rapidement.

Ces propriétés peuvent présenter des avantages considérables pour la construction de biomatériaux. Un cathéter intra-artériel fait de PMF est plutôt rigide à l'extérieur du corps (sous la température de transition vitreuse) et peut facilement être poussé par le médecin via une incision dans la peau. Cependant, lorsque la section insérée se retrouve au niveau du système artériel, elle est réchauffée par le sang (au-dessus de la température de transition vitreuse) et s'assouplit. Ceci permet à l'extrémité du cathéter

d'être facilement guidée dans les conduits artériels sans érafler ou perforer la paroi artérielle (Frenger, 1993).

2.7. AUTRES POLYMÈRES

2.7.1. L'alginate

L'alginate est largement utilisé dans l'industrie alimentaire, où il sert d'émulsifiant, d'épaississant, de stabilisateur ou de gélifiant. Il est aussi utilisé dans la fabrication de peintures au latex, de céramiques et même d'explosifs. L'alginate est un composé qui est aussi communément utilisé dans l'industrie cosmétique, dentaire et pharmaceutique (Roeck-Holtzhauer, 1991; Doubleday, 1998; Read *et al.* 2001). Plusieurs applications, comme la libération de médicaments (Rajinikanth, Sankar et Mishra, 2003; Jerry *et al.* 2001), de facteurs de croissance (Laham *et al.* 1999; Raymond, Metcalfe, Desfaits *et al.* 2003), la régénération du cartilage (Dausse *et al.* 2003), l'embolisation de malformations artérioveineuses (MAV) (Becker *et al.* 2002) et les greffes cellulaires transcathéter (Abruzzo *et al.* 2001) ont entre autres été étudiées.

L'alginate est un polysaccharide naturel provenant de la paroi cellulaire d'algues brunes (*Phaeophycota*). C'est le sel de l'acide alginique obtenu par extraction depuis l'algine. Il est l'équivalent de la cellulose retrouvée dans les plantes terrestres. Les alginates sont des hétéropolysaccharides formant des chaînes faites de blocs d'acide mannuronique et guluronique (figure 2.18). La composition des blocs dépend des espèces utilisées pour l'extraction et de la partie du thalle (appareil végétatif des végétaux inférieurs) à partir de laquelle l'extraction est faite. Les alginates semblent présents dans la plupart des variétés d'algues brunes, mais ne sont présents en quantités exploitables (30-45% du poids sec) que chez certains grands varech et fucus (Laminariales et Fucales).

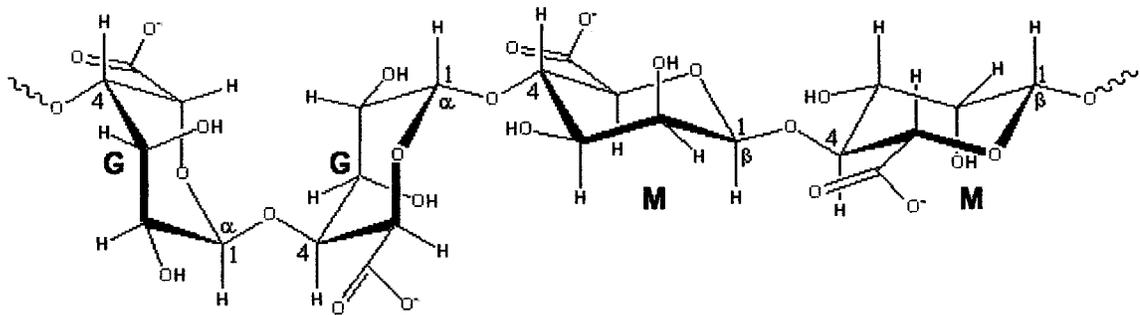


Figure 2.18. Structure chimique des alginate (Chaplin, 2003).

Hydrocolloïdes irréversibles, les alginate sont généralement présentés sous forme d'une poudre qui, en présence d'eau, donne un sel se transformant, par précipitation, en gel. L'ammoniac et les sels métalliques alcalins de l'acide alginique se dissolvent facilement dans l'eau froide, à basses concentrations, pour donner des solutions visqueuses (Guiry, 2003).

L'alginate peut être utilisé comme agent embolisant. Une forme aqueuse peut facilement s'injecter à travers des microcathéters et se changera en forme solide par formation de ponts calciques et polymérisation lorsqu'il est en contact avec une solution de chlorure de calcium. Un microcathéter à double lumière terminé par un canal commun permet d'injecter des « filaments d'alginate » et d'emboliser les anévrismes, d'une façon sensiblement identique à l'embolisation par spires.

2.7.2. Le poloxamère

Le poloxamère 407 est un surfactant non-ionique, c'est à dire que lorsqu'il est introduit dans un liquide, il en abaisse la tension superficielle, ce qui a pour effet d'en augmenter les propriétés mouillantes (OLF, 2003). Il constitue un des copolymères séquencés de polyoxyéthylène:polyoxypropylène disponibles commercialement et est constitué à

environ 70% de polyoxyéthylène et environ 30% de polyoxypropylène (figure 2.19). Le poloxamère 407 a une faible toxicité, une excellente compatibilité avec les autres produits chimiques et une grande capacité de solubilité pour différents médicaments (Zhang *et al.* 2002). L'incorporation de médicaments à l'intérieur de micelles formées de poloxamère résulte en une augmentation de la solubilité, puisque ces micelles sont plus solubles que le médicament lui-même, en une augmentation de la stabilité métabolique, ainsi qu'en une augmentation du temps de circulation du médicament (Kabanov, Batrakova et Alakhov, 2002). Dans certains cas, le poloxamère peut causer la sensibilisation de cellules cancéreuses (Kabanov, Batrakova et Alakhov, 2002). De plus, la chaîne moléculaire simple du copolymère permet le transport du médicament à travers la barrière hémato-encéphalique (barrière sang-cerveau) qu'il serait habituellement peu enclin à traverser, ce qui fournit un transport accru au cerveau et augmente la biodisponibilité (Kabanov, Batrakova et Alakhov, 2002). Le poloxamère 407 montre une gélification thermique réversible unique (Zhang *et al.* 2002). En effet, contrairement au polyoxyéthylène qui est hydrophile dans une large gamme de températures, les interactions du polyoxypropylène avec l'eau sont fortement température-dépendantes, puisqu'il est hydrophile à des températures proches de 0°C. Les interactions du poloxamère 407 avec l'eau peuvent donc être contrôlées par sa composition et par la température (Krakovský *et al.* 2003). À une concentration de 20% en solution aqueuse, le poloxamère 407 peut passer d'une solution de faible viscosité à 4°C, à un gel semi-solide lorsqu'il est chauffé à la température corporelle (Zhang *et al.* 2002).

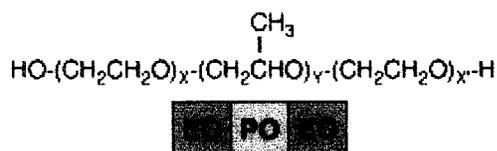


Figure 2.19. Structure chimique du poloxamère 407.

Le fait que le poloxamère 407 soit liquide à basse température et qu'il devienne un gel semi-solide à une température donnée, dépendante de sa concentration, lui permet donc d'être injecté par des cathéters et occlure temporairement un site donné. Le temps d'occlusion dépendra du système où il sera injecté, de la température et de sa concentration. Si le poloxamère 407 est injecté au niveau du système artériel, au bout d'un certain temps d'occlusion, celui-ci commencera à se dissoudre dans le sang et disparaîtra tout à fait, rétablissant la circulation.

De tels gels pourraient, par exemple, permettre la livraison localisée de médicaments et minimiser leur dispersion dans tout l'organisme. Une plus grande quantité de médicament pourrait ainsi atteindre le site visé, tout en réduisant la possibilité de réactions systémiques adverses (Zhang *et al.* 2002). Une autre avenue d'application possible est la thérapie génique vasculaire. En effet, le poloxamer 407 permet une nette augmentation de l'efficacité du transfert viral *in vivo* direct, du moins chez les modèles animaux (Feldman *et al.* 1997; van Belle *et al.* 1998). Cet agent embolisant temporaire sécuritaire pourrait donc arrêter localement la circulation pendant 10-20 minutes, permettre le transfert génique au niveau de la paroi artérielle, puis assurer par sa solubilisation une reperméabilisation complète sans trauma vasculaire, ce qui simplifie grandement la technique de transfert génétique.

Le poloxamère 407 aurait des propriétés utiles à plusieurs autres applications, parmi lesquelles on retient la stimulation des macrophages, la stimulation de la production de facteur de croissance de l'épiderme (EGF), la fabrication de particules à circulation prolongée et de gels à libération prolongée (Moghimi et Hunter, 2000).

CHAPITRE 3. DÉTAILS TECHNIQUES ET EXPÉRIMENTAUX

Nous n'avons retenu ici que certains détails qui n'apparaissent pas dans l'article : « Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) polyurethane-based foam is a new shape memory polymeric self-deployable structure. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(3):491-497. Erratum in: *Biomaterials*. 2003 Apr;24(9):1681 ».

3.1. MATÉRIEL

3.1.1. CHEM

L'éponge de CHEM, faite à base de polyuréthane (Mitsubishi Heavy Industry and Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91109) et ayant une température de transition vitreuse (T_g) de 60°C et une densité de 0.032 g/cm³ a été soumise à l'évaluation de sa cytotoxicité et mutagénicité *in vitro*.

3.2. MÉTHODES

3.2.1. Biocompatibilité

Les tests de biocompatibilité ont été effectués par Biomatech, Zone Industrielle de l'Isilon, 115 Rue Pasteur, 38670 Chasse-sur-Rhone, France.

3.2.1.1. Cytotoxicité

Un test de cytotoxicité a été effectué sur le CHEM, en accord avec la norme ISO 10993-5 (Évaluation biologique des dispositifs médicaux, Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité *in vitro*). Un milieu essentiel minimal (MEM (1X)), additionné de L-

Glutamine (1%), de sérum (10%) et d'une concentration d'antibiotiques appropriée (MEM supplémenté), a été utilisé comme véhicule d'extraction (0.2g de CHEM/ml de milieu de culture, durant 24-26h à 37°C).

Des cellules fibroblastiques de souris L-929 ont été utilisées (recommandées par la norme ISO 10993-5). Ces cellules ont été cultivées à 37° dans un environnement gazeux contenant 5% de CO₂ dans un flacon ventilé contenant du MEM supplémenté. Pour cette étude, des plaques de 96 puits ont étéensemencées et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ de façon à obtenir des couches mono-cellulaires confluentes.

Des puits contenant des couches mono-cellulaires confluentes ont été sélectionnés en triple exemplaire. Le milieu de culture a été remplacé par 200 µl de l'extrait de CHEM (concentrations 100%) ou de ses dilutions (concentrations 50%, 10% et 1%). De façon similaire, des puits ont été préparés en triple exemplaire pour les contrôles négatifs et positifs en remplaçant le milieu de culture par 200 µl de leurs extraits ou de leurs dilutions. Du MEM supplémenté a été utilisé comme contrôle négatif, tandis que du phénol 6.4 g/l préparé de manière extemporanée en MEM supplémenté. Les contrôles ont été dilués de la même façon que l'extrait du produit testé. Les extraits du CHEM et les contrôles ont été incubés à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 24 heures.

Après incubation, les cultures ont été colorées par une solution de rouge neutre et examinées au microscope (100X) pour déterminer la morphologie cellulaire. Les cellules ont alors été fixées, le colorant a été extrait des cultures et la densité optique (DO) a été mesurée.

La détermination qualitative de la cytotoxicité a été réalisée selon les critères suivants :

Tableau 3.1. Détermination qualitative de la cytotoxicité

| INDEX DE RÉPONSE | DESCRIPTION DES CULTURES | INTERPRÉTATION |
|------------------|---|----------------------|
| 0 | Cellules intactes, colorées, couche confluyente | Non cytotoxique |
| 1 | Cellules colorées avec une légère baisse de la densité cellulaire | Cytotoxicité légère |
| 2 | Cellules colorées avec une forte baisse de la densité cellulaire | Cytotoxicité modérée |
| 3 | Lyse cellulaire ou absence complète d'incorporation du colorant | Cytotoxicité sévère |

La détermination quantitative de la cytotoxicité a été réalisée en mesurant les densités optiques dans les 3 puits des extraits des échantillons, des contrôles négatifs et positifs. Une moyenne a été calculée et comparée à celle du contrôle négatif. Un pourcentage de réduction par rapport au contrôle négatif a été calculé.

Afin de valider le système, le contrôle négatif doit avoir été non cytotoxique (index de réponse 0). Le contrôle positif aux concentrations 50% et 100% doit avoir présenté une cytotoxicité sévère (index de réponse 3) et une réduction de la densité cellulaire d'au moins 75% par rapport au contrôle négatif.

Le produit testé a satisfait aux exigences du test lorsqu'aucune des cultures cellulaires exposées à l'extrait du produit n'a présenté de réduction de la densité cellulaire supérieure à 25%. Le test aurait été répété si les contrôles n'avaient pas présenté les résultats attendus et/ou si l'un des trois puits n'avait pas conduit à la même conclusion que les autres.

3.2.1.2. Mutagénicité

Le test d'Ames (test de mutations réverses) a été réalisé sur un extrait de CHEM afin d'évaluer son potentiel mutagène. Ce test a été effectué selon la norme ISO 10993-3 (Évaluation biologique des dispositifs médicaux, Partie 3: Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction) et selon une adaptation des directives 471 de l'OCDE : Test d'Ames et de la Directive Européenne, méthode B14.

L'espèce *Salmonella typhimurium* LT2 a été utilisée comme système réactif (souches TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538) (MOLTOX, Boone, USA).

Tableau 3.2. Génotype des souches TA utilisées.

| Souches | Mutations | | | | |
|---------|-----------|--------------------------|------------|-----------------------|-------------------|
| | Histidine | Type de mutation réverse | LPS | Système de réparation | Plasmide R-factor |
| TA98 | HIS D3052 | Délétion | <i>rfa</i> | <i>uvr B</i> | pKM 101 |
| TA100 | HIS G46 | Substitution | <i>rfa</i> | <i>uvr B</i> | pKM 101 |
| TA1535 | HIS G46 | Substitution | <i>rfa</i> | <i>uvr B</i> | no |
| TA1537 | HIS C3076 | Addition | <i>rfa</i> | <i>uvr B</i> | no |
| TA1538 | HIS D3052 | Délétion | <i>rfa</i> | <i>uvr B</i> | no |

Légende :

rfa : cette mutation induit une perte partielle de la synthèse des lipopolysaccharides de membrane et augmente la perméabilité aux grosses molécules.

uvr B : cette mutation est une délétion du gène codant pour le système de réparation de l'ADN par excision.

pKM 101 : ce plasmide code pour la résistance à l'ampicilline et augmente la mutagenèse chimique et spontanée en accroissant les risques d'erreurs au cours de la réparation de l'ADN.

3.2.1.2.1. Justification du système réactif

Les souches bactériennes testées possèdent différentes spécificités qui les rendent plus sensibles aux mutations, telles que les séquences d'ADN responsables des sites de réversion (mutation inverse), l'augmentation de la perméabilité aux grosses molécules et la suppression du système de réparation de l'ADN ou l'augmentation des risques d'erreurs au cours de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches bactériennes testées peut apporter de précieuses informations sur le type de mutations induites par les agents génotoxiques.

3.2.1.2.2. Extraction

Une solution de NaCl 0.9% a été utilisée comme véhicule d'extraction (0.2 g de NaCl/ml de NaCl, durant 72h à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

3.2.1.2.3. Étude principale

Dans cette étude, l'extrait a été testé à la concentration de 100 μl d'extrait par boîte. 100 μl d'extrait ont été mélangés à 2 ml de gélose surcouche (agar, NaCl, biotine et L-histidine) et à 100 μl d'une des 5 cultures bactériennes (contenant approximativement 10^8 cellules viables). Le mélange a été étalé sur une boîte de pétri contenant du milieu Vogel-Bonner. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 72 heures. Dans le cas des essais en présence d'activation métabolique, 500 μl du système d'activation (S9 Mix) ont été ajoutés au mélange souche-extrait-gélose de surcouche. Le système d'activation métabolique, contenant la fraction post mitochondriale S9, a été obtenu après administration d'Aroclor 1254 chez le rat mâle Sprague-Dawley.

Cette concentration a été testée 3 fois sous un volume constant de 100 μl avec et sans activation métabolique sur chaque souche bactérienne. Après incubation à 37°C pendant

48-72 heures, le nombre de colonies réversées par boîte a été dénombré et, ainsi, la mutagénicité du CHEM a été déterminée.

3.2.1.2.4. Contrôles

3.2.1.2.4.1. *Contrôle de l'essai*

Le 2-nitrofluorène a été utilisé comme contrôle positif pour démontrer que les souches test TA98 et TA1538 sont sensibles à l'état sauvage. Le méthyl méthanesulfate a été utilisé comme contrôle positif pour la souche TA100. L'éthyl méthanesulfonate a été utilisé comme contrôle positif pour la souche TA1535. Le 9-aminoacridine a été utilisé comme contrôle positif pour la souche TA1537.

L'activité du mélange Sg Mix a été contrôlé avec le 2-Aminoanthracène (ou 2-anthramine).

Des contrôles de stérilité ont été effectués sur le produit à étudier, sur le mélange d'activation Sg Mix et sur le véhicule.

Tous les résultats se sont montrés conformes aux normes.

3.2.1.2.4.2. *Contrôle des souches*

Le nombre de colonies obtenues en absence de tout traitement des souches (réverses spontanées) a été contrôlé. Les caractères génétiques de chaque souche ont été contrôlés et sont conformes aux exigences.

3.2.1.2.5. Observation et analyse des données

À la fin de la période d'incubation, les colonies (ou réverses) apparues sur chaque boîte ont été dénombrées. Chaque comptage a été noté et analysé.

Pour chaque souche bactérienne utilisée et pour la concentration d'extrait testée, de contrôles positifs et négatifs en présence ou non d'activation métabolique, la moyenne des colonies apparues sur les boîtes et l'écart type ont été calculés.

Après avoir analysé la conformité des contrôles, une évaluation des données relevées en présence du produit étudié a été effectuée selon le barème suivant :

Résultats non significatifs : si le nombre de colonies apparues en présence du produit étudié est inférieur à 2 fois le nombre de colonies apparues en présence du contrôle négatif (contrôle NaCl).

Résultats significatifs : si le nombre de colonies apparues en présence du produit étudié est supérieur ou égal à 2 fois le nombre de colonies apparues en présence du contrôle négatif.

3.2.2. Tests in vivo

3.2.2.1. Anévrismes expérimentaux et occlusion endovasculaire d'artères maxillaires

Un modèle d'anévrisme latéral canins a été utilisé pour les études *in vivo*. Ce modèle a été étudié de façon extensive dans notre laboratoire (Raymond, Desfaits et Roy, 1999; Raymond, Berthelet, Desfaits *et al.* 2002; Raymond, Sauvageau, Salazkin *et al.* 2002; Metcalfe *et al.* 2003; Raymond, Metcalfe, Desfaits *et al.* 2003; Raymond, Leblanc,

Morel *et al.* 2003) et présente des récives à 3 semaines (Raymond, Desfaits et Roy, 1999).

Des anévrismes latéraux carotidiens ont été construits chez 6 chiens Beagle et 2 chiens de races croisées adultes, pesant 20-25 kg, en utilisant une modification de la technique de German et Black (German et Black, 1954). Brièvement, deux segments venant de la même veine jugulaire externe ont été cultivés afin de servir de poches veineuses. Après une occlusion temporaire de l'artère carotidienne commune, une artériotomie ovale de 5 mm de diamètre a été créée et l'on y a attaché la poche veineuse ouverte, à l'aide de points de suture faits à l'aide d'un fil Prolène 7.0. Un block de 10x5x5 mm du polyuréthane (CHEM) a été inséré dans chaque anévrisme (8 chiens, 16 anévrismes) et le fundus de l'anévrisme a ensuite été ligaturé (figure 3.1). Une angiographie carotidienne de contrôle a été faite immédiatement après la chirurgie afin de détecter des collets résiduels et des complications telles qu'une sténose ou une occlusion de l'artère porteuse.

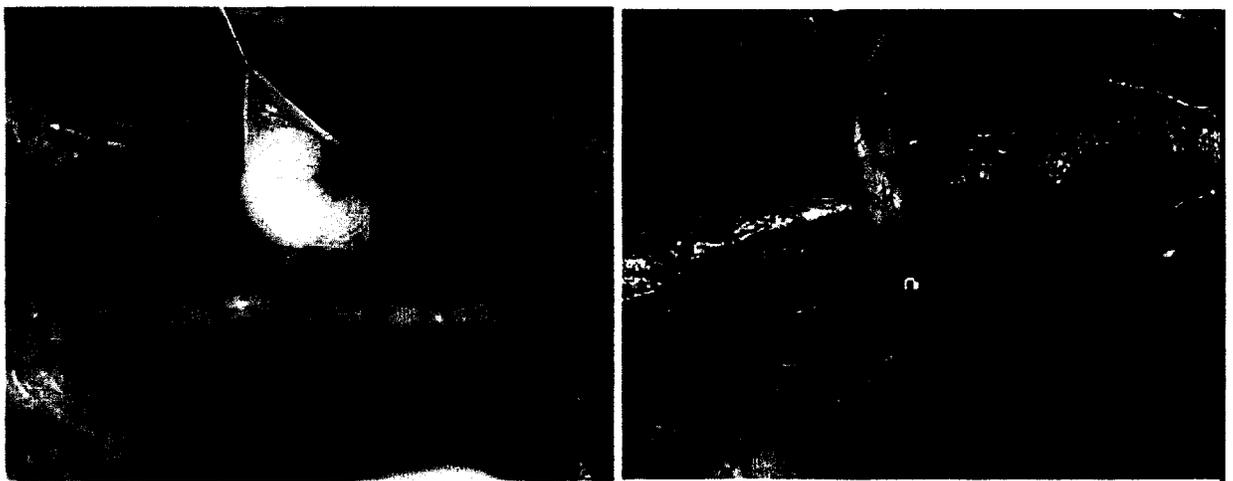


Figure 3.1. Construction d'un anévrisme expérimental chez le chien.

Au moment de l'angiographie de contrôle, faite immédiatement après la chirurgie, des éponges de 8x4x4 mm, compressées, ont été introduites jusqu'aux maxillaires à l'aide de cathéters 6F introduits via une ponction fémorale. Un total de 4 artères maxillaires internes ont été ainsi occluses (essais endovasculaires effectués sur 2 chiens seulement). Le statut de chaque collet anévrismal, ainsi que l'occlusion des maxillaires ont été de nouveau établis par une angiographie carotidienne de suivi, faite immédiatement avant le sacrifice, à 3 semaines (6 chiens) et 3 mois (2 chiens).

Les résultats angiographiques ont été établis selon une classification utilisant des scores angiographiques. Un score de 0 indiquant une oblitération complète, 1 des « dog ears », 2 un collet résiduel et 3, un anévrisme résiduel (Raymond, Desfaits et Roy, 1999) (figure 3.2).

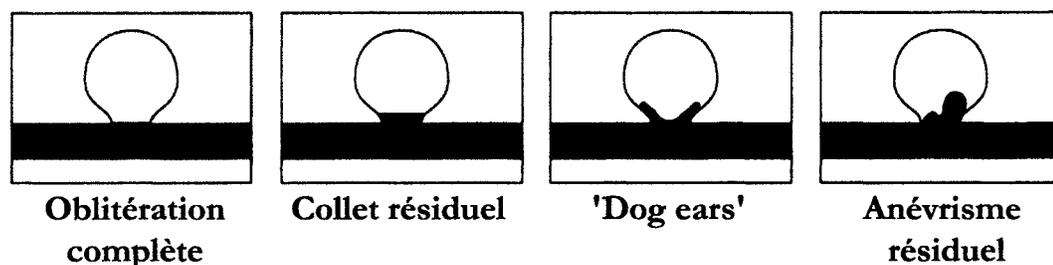


Figure 3.2. Représentation schématique de la classification des résultats angiographiques (Roy *et al.* 1997).

3.2.2.2. Pathologie

Les maxillaires et les anévrismes ont été réséqués en bloc et fixés dans une solution aqueuse de formaldéhyde 10%. Les sujets embolisés à l'aide des blocs de polymère ont été sacrifiés à 3 semaines et 3 mois, selon le cas, afin d'observer la formation néointimale au collet et la réaction tissulaire à l'agent embolisant. Les échantillons

prélevés ont été photographiés et ensuite inclus dans la paraffine. Des sections axiales de 5 microns d'épaisseur ont été coupées au milieu des anévrismes, ainsi qu'au milieu des maxillaires à l'endroit de l'occlusion (coupes transversales). Les lames (préparations microscopiques) ainsi obtenues ont été colorées à l'aide d'hématoxyline-phloxine(érythrosine)-safran (HPS) et à l'aide du pentachrome de Movat, puis photographiées.

CHAPITRE 4. Cold Hibernated Elastic Memory foams for endovascular interventions

Biomaterials. 2003 Feb;24(3):491-7. Erratum in: Biomaterials. 2003 Apr;24(9):1681.

Cold Hibernated Elastic Memory foams for endovascular interventions

Annick Metcalfe^{a,b,*}, Anne-Cécile Desfaits^a, Igor Salazkin^a, L'Hocine Yahia^b, Witold M. Sokolowski^c, Jean Raymond^a.

^a Interventional Neuroradiology Laboratory, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Mailloux Pavilion M-8206, 1560 Sherbrooke East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada

^b Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique, PO Box 6079, Montreal, Quebec H3C 3A7, Canada

^c Current address: Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91109, USA

* Correspondence address: Interventional Neuroradiology Laboratory, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Mailloux Pavilion M-8206, 1560 Sherbrooke East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada. Tel.: 514-890-8000-27206; fax: 514-412-7603; E-mail address: annick.metcalfe@polymtl.ca.

4.1. ABSTRACT

Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) polyurethane-based foam is a new shape memory polymeric self-deployable structure.

Standard cytotoxicity and mutagenicity tests were conducted on CHEM *in vitro*, to ensure biocompatibility before studying potential medical applications. *In vivo*, lateral wall aneurysms were constructed on both carotid arteries of 8 dogs. Aneurysms were occluded per-operatively with CHEM blocks. In 2 dogs, CHEM embolization was compared with gelatin sponge fragment embolization. Internal maxillary arteries (Imax) were also occluded with CHEM using a 6F transcatheter technique. Angiography and pathology were used to study the evolution of aneurysms and Imax at 3 and 12 weeks. Imax embolized with CHEM foam remained occluded at 3 weeks. Most aneurysms embolized with CHEM showed a small residual crescent of opacification at initial angiography, but angiographic scores were significantly better at 3 weeks. Thick neointima formation over the CHEM at the neck of aneurysms was demonstrated at pathology. The foamy nature of CHEM favours the ingrowth of cells involved in neointima formation. New devices for endovascular interventions could be designed using CHEM's unique physical properties.

Keywords: polyurethane; shape memory polymer (SMP); cold hibernated elastic memory (CHEM); aneurysm; endovascular; embolization.

4.2. INTRODUCTION

In the last 10 years, endovascular procedures have gained popularity as an alternative to surgery in the treatment of a variety of vascular diseases, including arterial aneurysms [1-3]. While their feasibility and their immediate efficacy in the prevention of aneurysmal rupture has now been established, most endovascular interventions on aneurysms have important drawbacks such as a significant incidence of residual lesions, deficient healing at the neck, or recurrences [4-6]. Therefore, the search for new and more effective occlusive materials continues [7-9].

Polyurethanes (PU), because of their low thrombogenicity, are polymers widely used in the construction of hematology related products and devices [10-12].

Shape memory polyurethanes (SMPu) are being intensely investigated as biomaterials. SMPus possess valuable characteristics, such as high biocompatibility, unique mechanical properties, as well as an ability to soften at body temperature. The concept called "Cold Hibernated Elastic Memory" (CHEM) utilizes polyurethane-based shape memory polymers (SMP) in open cellular (or foamy) structures. The material's shape-memory function combined with the foam's elastic recovery allows for reversible shape changes and precision in shape retention.

The combination of all these properties suggests that CHEM polyurethane could be used as an occlusive material for embolization procedures. Therefore, we wanted to test its *in vitro* cytotoxicity and mutagenicity. Since CHEM could potentially be used as a filling material to occlude aneurysms, we assessed the biological reaction to CHEM embolization of experimental canine aneurysms.

4.3. MATERIAL AND METHOD

4.3.1. Material

4.3.1.1. *CHEM Polyurethane*

CHEM polyurethane-based foam (Mitsubishi Heavy Industry and Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91109) with a glass transition temperature (T_g) of 60⁰C and a density of 0.032 g/cm³ was submitted for evaluation of cytotoxicity and mutagenicity *in vitro*.

4.3.2. Methods

4.3.2.1. *CHEM cytotoxicity*

A cytotoxicity test on CHEM was conducted according to the ISO 10993 requirements (Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity) [13]. Minimum Essential Medium (MEM (1X)) supplemented with L-glutamine (1 %) and serum (10 %) was used as the extraction vehicle (0.2 g of CHEM/ml of culture medium, for 24-26 hours at 37°C). The test extract was diluted ($1/1$, $1/2$, $1/10$ and $1/100$) in supplemented MEM and placed onto triplicate confluent monolayers of L-929 mouse fibroblasts cells (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany). Separate monolayers were prepared for triplicate negative and positive controls (phenol: 6,4g/L). After incubating at 37°C in 5% CO₂ for 24 hours, the cell cultures were stained with a neutral red solution and cell morphology examined microscopically (100X). The dye was then extracted from the cultures with a destaining solution of ethanol and glacial acetic acid, and optical density was measured (550 nm).

4.3.2.2. CHEM Mutagenicity

The mutagenic potential of CHEM was assessed using the Ames bacterial Reverse Mutation Test (gene mutation test). This study was conducted according to the ISO 10993 requirements (Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity) [14], and according to a modification of Organization for Economic Cooperation and Development (Guidelines n°471: Bacterial Reverse Mutation Test and EEC Directive – Method B14). The bacterial reverse mutation test is commonly used as initial screen for genotoxic activity and more particularly for point mutation inducing activity. The reversion of bacteria from growth-dependence on a particular amino acid to growth in the absence of that amino acid is the most widely used marker in reverse-mutation assays. Strains of histidine-dependent *Salmonella typhimurium* were used. The test strains do not grow in the absence of histidine, and thus growth indicates that exposure to a genotoxic agent has caused point mutations that have produced bacterial strains that no longer require histidine to grow.

Suspensions of 5 amino acid requiring (histidine-dependent) strains of *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, and TA1538) were exposed to 0.2g/ml of CHEM extracted in 0.9% NaCl in presence and absence of an exogenous metabolic activation system. Following incubation, revertant colonies due to point mutations were counted and compared to the number of spontaneous revertant colonies on solvent control plate. Similarly, specific standard mutagens were used as positive controls.

4.3.2.3. Experimental aneurysms and angiography

Bilateral common carotid lateral wall aneurysms were constructed in 8 (2 mongrel and 6 Beagle) dogs (16 aneurysms) using a modification of the technique of German and Black [15,16]. Briefly, two segments of the same external jugular vein were harvested to serve as venous pouches. After temporary occlusion of the common carotid artery, an

oval arteriotomy measuring 5 mm in diameter was created to which the open venous pouch was sutured using 7.0 Prolene. A sterile CHEM polyurethane block measuring 10 x 5 x 5 mm was taken from its bathing solution (1X-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) and inserted from the fundus into the aneurysm in such a fashion to produce near-complete obliteration of aneurysms. In 2 animals CHEM embolization was compared to gelatin sponge (Gelfoam, Upjohn Canada) embolization on the controlateral side [17]. The fundus was then closed. Post-operative angiography was performed under the same anesthesia, using 5F catheters introduced by femoral puncture.

During post-operative angiography, CHEM sponges measuring 8 mm long and 4 mm in diameter were compressed into 6F catheters introduced into Imax. A total of 4 Imax (2 dogs) were occluded using CHEM sponge as the embolic agent. Post-procedure angiography was used to document Imax occlusion.

For the first 6 dogs, follow-up carotid angiography was performed prior to sacrifice at 3 weeks. For the last 2 dogs, comparing gelatin sponge and CHEM, angiography was performed at 3 and 12 weeks, prior to sacrifice. Angiographic results were scored according to a classification previously described [5]. A score of 0 was attributed to complete obliteration, 1 to "dog ears", 2 to residual necks and 3 to residual or recurrent aneurysms (Fig. 4.1). A dog ear is a small triangular unilateral segment of the neck/vessel junction visible in one projection. A residual neck was defined as the persistence of the original defect in the arterial wall, but without aneurysmal opacification. Mean initial angiographic scores and scores at 3 weeks were compared using a Wilcoxon Signed Ranks Test.

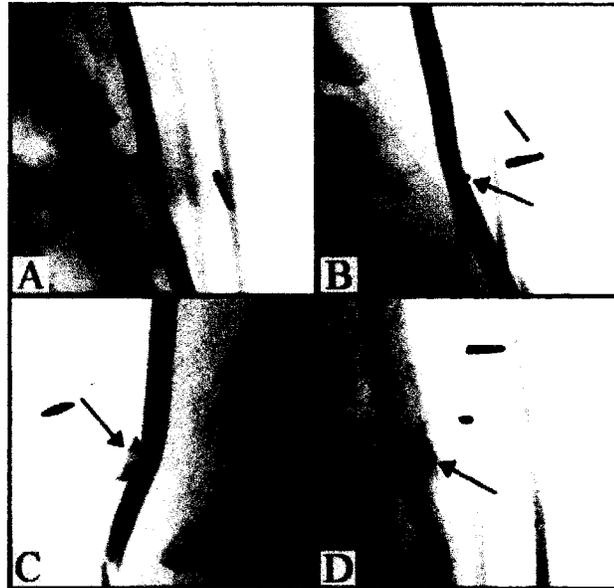


Figure 4.1. Angiographic findings 3 weeks after surgical construction and CHEM embolization. Oblique projections during selective carotid angiography show: (A) completely ocluded aneurysm (angiographic score of 0), with no residual flow entering in the aneurysm; (B) dog ear (score of 1), or a small unilateral segment of the neck; (C) residual neck (score of 2); (D) residual aneurysm (score of 3). Arrows are indicating residual opacification of the aneurysmal cavity.

4.3.2.4. Histology

Carotid and maxillary arteries were resected “en bloc” and fixed in 10% formalin. Carotid arteries were opened along a longitudinal incision and the necks of aneurysms were photographed “en face”, to study the completeness of the neck occlusion and the nature of the tissue formed on the embolic agent. In a similar fashion, Imax were sectioned along an axial plane and the cut sections were photographed. Five micron thick axial sections obtained through the middle of each aneurysm and from each Imax

were embedded in paraffin. Slides were stained with hematoxylin-phloxin-safran (HPS) and Movat's pentachrome stain.

4.4. RESULTS

4.4.1. CHEM cytotoxicity and mutagenicity

The CHEM extracts revealed no evidence of cell lysis, nor cytotoxicity (reduction of cell density lower than 25%), for $1/1$, $1/2$, $1/10$, and $1/100$ dilutions. All dilutions of the CHEM extracts meeting the strict requirements of the test.

The CHEM extract was not toxic, nor mutagenic, in the tested strains of *Salmonella typhimurium*.

4.4.2. Angiographic findings

Results of postoperative or 21 day follow-up angiograms are summarized in Table 4.1 and illustrated Figure 4.1.

Table 4.1. Angiographic scores of aneurysms treated with CHEM.

| Aneurysms | 1L | 1R | 2L | 2R | 3L | 3R | 4L | 4R | 5L | 5R | 6L | 6R | 7L | 8R | □ | □ |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|------|
| Day 0 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2.4 | 0.76 |
| Day 21 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1.6 | 0.84 |

* $p < 0,013$ by a Wilcoxon Signed Ranks Test.

All aneurysms showed a residual lesion after embolization. Most aneurysms showed some progressive obliteration of the residual lesion with time, as shown in Table 4.1.

The median angiographic score at 3 weeks was significantly smaller than the initial score ($p < 0.013$). Only 2 animals were followed for 3 months. At 3 months, angiographic scores were 1 and 1 for gelatin sponge embolization, and 0 and 2 for CHEM embolization.

Post-procedure angiography revealed that all I_{max} were occluded and remained occluded at 3 weeks.

4.4.3. Macroscopic observations

At 3 and 12 weeks, dissection and macroscopic observations of the aneurysms showed the formation of a thick neointima at the neck of the aneurysm, at the surface of the embolic agent (Fig. 4.2). A few aneurysms showed only small residual clefts between the embolic agent and the aneurysmal wall (Fig. 4.2A, B and C). Only one aneurysm showed a residual lesion. Transversal sections of the embolized I_{max} revealed complete occlusion of arteries.

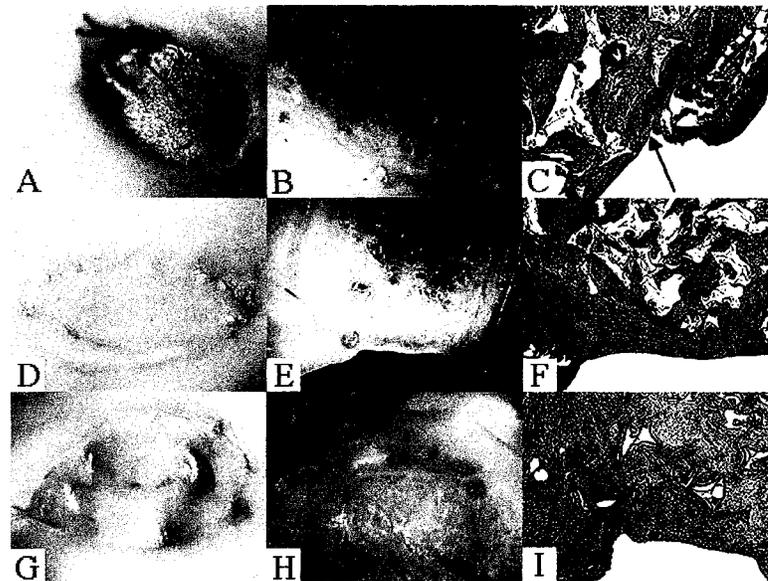


Figure 4.2. Macroscopic and microscopic appearance of lateral wall common carotid aneurysms embolized with CHEM sponges, at 3 and 12 weeks. (A-I) Healed aneurysms, with formation of a thick neointima. The first aneurysm (A-C) shows only a small crescent of recanalization (arrows), and the two others (D-I) are perfectly healed. Macrophotographs of aneurysm necks “en face” (A, D, G), and of axial sections of aneurysms (B, E, H). C, F and I are microscopic views of axial sections (original magnification X20).

4.4.4. Histological findings

Healing phenomena following embolization of aneurysms with collagen sponges have been well described [17]. Following embolization of aneurysms with CHEM sponges, there was a minimal inflammatory reaction, but an important infiltration of fibrocellular tissue within the CHEM trabeculae at 3 and 12 weeks. The surface of the CHEM was

covered with a thick neointima, sealing most of the neck of aneurysms. Deep inside the CHEM there was some clot, alternating with areas of connective tissue, indicating thrombus formation inside the CHEM and replacement of this thrombus by granulation tissue.

Imax were completely packed with CHEM, with no blood captured between the CHEM and the vascular wall. There was poor cellular infiltration at the periphery of the CHEM blocks. At 3 weeks, they were still infiltrated with thrombus not replaced by connective tissue.

4.5. DISCUSSION

Shape memory biocompatible materials have appealing properties for the design of endovascular devices: they can be miniaturized and deformed, to be introduced through small catheters, and they can recover a larger predetermined shape once placed in satisfactory position. These “intelligent” materials, such as shape memory alloys (SMA), have already been introduced in clinical practice to meet some of the challenges involved in minimally invasive techniques to repair arterial stenosis or aneurysms [18,19].

Compared to SMAs, such as Nitinol used in some endovascular coils and stents, SMPs present several advantages: they have a lower density, a much higher inelastic strain (plastic deformation) recovery and processing is easier at lower cost [20,21]. Mechanical properties of SMAs can be adjusted within a limited range [22]. The macroscopic properties such as transition temperature and mechanical properties of SMPs can be adjusted over a wide range with only small changes in the chemical structure and composition [22,23].

The concept called “Cold Hibernated Elastic Memory” or CHEM (patent pending) has been developed by Sokolowski *et al.* [24-28], as a new, simple, ultra-light, self-deployable smart structure. It utilizes polyurethane-based shape memory polymers in open cellular (foam) structures. Foaming may be accomplished during the prepolymer process. First, a specific diisocyanate and polyol are reacted in a specific molar ratio to give a prepolymer. Later, the chain extender is added together with a physical or chemical blowing agent into a polymerizing mixture. Solid polyurethane-based SMP materials used in CHEM open cellular structures are unique because they exhibit large changes in elastic modulus (E) above and below the T_g (glass transition temperature). A large amount of inelastic strain (up to 400%) may be recovered by heating. The reversible change in the elastic modulus between the glassy and rubbery states of the

polymers can be as high as 500 times. The CHEM structures are self-deployable, using both shape memory properties combined with the foam's elastic recovery. The foam configuration ensures higher speed of deployment, better precision of original shape restoration and higher full/stowed volume ratio when compared with solid SMP materials [25]. In practice, the CHEM foams are compacted to small volume (1 to 20 in one direction) above their T_g and then may be stored below their T_g without constraint. Heating to a temperature above their T_g restores their original shape. The CHEM processing cycle is illustrated in Figure 4.3A.

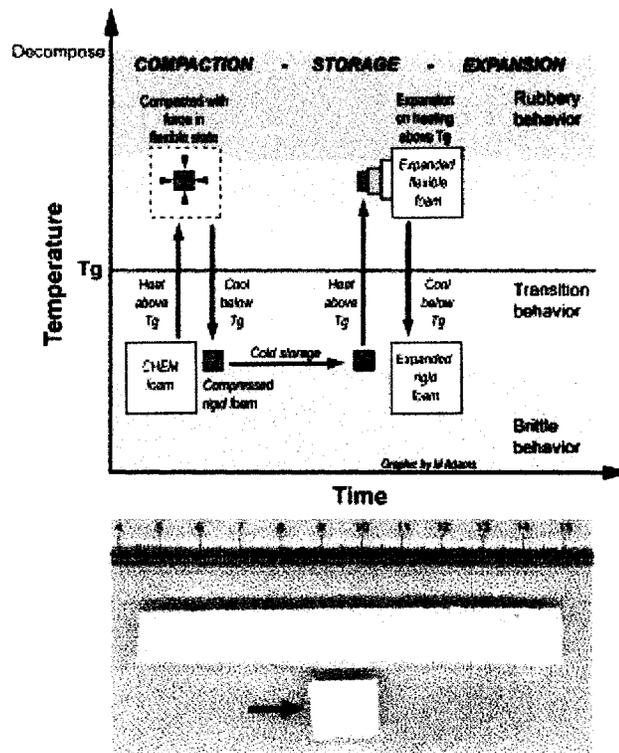


Figure 4.3. Up: CHEM processing cycle. Structures of any shape, made of CHEM foam, are compacted to small volumes in a flexible state above the T_g and later cooled below T_g to a glassy state, to be stowed for unlimited periods below T_g . The stowed structure can be heated above T_g to a flexible state and the original shape will be precisely restored. A fully deployed structure can be rigidized by cooling below T_g to a glassy state. Down: Deployed and stowed (arrow) CHEM structures (rods).

The advantage of this new technology is that structures, when compressed and stored below T_g , are a small fraction of their original size and are lightweight (2 orders of magnitude lighter than aluminium). The stowed and deployed CHEM structures are shown in Figure 4.3B.

Another attractive aspect is the wide range of Tg that can be selected for deployment and, if necessary, rigidization [20,21]. The Tg of CHEM can range from -100°C to $+80^{\circ}\text{C}$, including a Tg slightly below the human body temperature of $\sim 37^{\circ}\text{C}$.

The combination of all these properties plus natural CHEM foam porosity suggest that it has the potential to be used as an embolic agent, as a filling material to occlude aneurysms or as a component of self-deployable embolic devices.

The material's shape-memory function allows for reversible shape changes and shape retention. This phenomenon is explained on the basis of molecular structure and molecular motion. The molecular chains undergo micro-Brownian movement above the Tg (rubbery state), when the elastic modulus of the polymer material is low. In the rubbery state, the material is easily deformed by the application of an external force, and the molecular chains can be oriented in the direction of the tension. When the temperature is lowered below the Tg and the deformation remains constant, the micro-Brownian motion will be frozen and the chain orientation and deformation will be fixed. When the material is heated above the Tg, the micro-Brownian motion resumes, the molecular chains lose their orientation and the material will recover its original shape [21,27]. A Tg slightly below the human body temperature would be useful for the design of clinical devices. The CHEM would expand when inserted in the body, as it reaches a temperature of 37°C . The CHEM porosity can also be adjusted to the needs of the application: as an embolic agent at the neck of aneurysms, smaller open cells may be advantageous. Smaller cavities would not allow accumulation of large quantities of clot but still favour cell migration inside the sponge. Recanalization of clot has been involved in recurrences after endovascular treatment of aneurysms [29]. A change of Tg and the use of a larger volume of CHEM for each aneurysm could prevent recurrences of aneurysms occluded with CHEM sponges.

As a prerequisite to any potential biological application, standard assays on cytotoxicity and mutagenicity had to be performed, even though the final exact composition of the best variant of CHEM to be used in endovascular applications has not been determined. Polyurethanes are commonly known as being biocompatible [30] but specific tests of biocompatibility (toxicity and mutagenicity) were performed on this new material for the first time. As expected, CHEM was found to be non-toxic and non-mutagenic.

In vivo, the canine aneurysm model used to test the potential value of CHEM as an embolic agent has been extensively studied in our laboratory [5,16,17]. One advantage of the use of this model as a screening test has been the possibility of exploring the thrombogenicity of the material, the inflammatory reaction to its presence *in vivo*, as well as its ability to support neointimal tissue invasion essential to healing phenomena in vascular diseases [31]. With this per-operative embolization model, these properties could be explored without the need to engineer the final form of the agent that would have to meet specific mechanical requirements to be inserted into small catheters, and delivered in a controlled fashion. In this study, aneurysms embolized with CHEM showed a minimal inflammatory response, as compared with the moderate inflammation caused by gelatin sponges in the same model [16]. We have previously demonstrated that experimental aneurysms heal with the formation of a thick neointima at the neck [17,32] and that conversely, aneurysms that recur produce only a thin neointimal response [5,32]. Prosthetic vascular grafts made of impermeable Dacron or PTFE do not heal, even years after surgical interposition [33]. Polymers had to be woven into porous materials to support the ingrowth of granulation tissue and the formation of a neointima on the luminal side of vascular grafts. The porosity of CHEM may be an important characteristic of the material, which permitted cell invasion and neointima formation at its surface. Synthetic polymers do not have natural binding sites, and cell adhesion usually occurs via extra-cellular matrix (ECM) molecules adsorbed onto their surface. Fibrin deposition during thrombus formation on the surface and within the alveoli of CHEM likely provided the provisional matrix essential for cellular invasion at the neck

of treated aneurysms [5]. Vascular smooth muscle cells (VSMCs), or myofibroblasts migrate into this provisional matrix, secreting collagen and proteoglycans, forming the neointima, which ideally will seal the neck of aneurysms.

If thrombus is essential to neointima formation, an excessive thrombogenicity could lead to embolic complications. Similarly, if an embolic agent that favours neointima formation promotes healing after endovascular treatment of aneurysms, a neointima too thick could cause parent vessel stenosis. The fact that residual necks present immediately after embolization remained patent 3 weeks later suggest that the thrombogenicity of the material was minimal and neointima formation not sufficiently hypertrophic to close these small residual spaces.

After 3 weeks, or 3 months, some aneurysms had slit-like endothelialized crescents at the interface between the CHEM sponge and the walls of the aneurysms, starting at the neck and extending quite deep inside the aneurysmal sac. As VSMCs or myofibroblasts invade the thrombus to secrete collagen, endothelial cells (ECs), migrate at the thrombus surface, maintain a non-thrombogenic surface and re-permeabilize “corners” of the aneurysm. This phenomenon, that seems to be related to rapid endothelialization, has been demonstrated on specimens as early as one week post-embolization [29]. It seems to be as fundamental to vascular healing and recovery of vascular integrity as neointima formation, but may be responsible for recurrences after endovascular treatment of aneurysms.

With gelatin sponge embolization, residual necks are frequent and increase at 3 weeks [5]. In contrast, CHEM embolization led to improved angiographic scores at 3 weeks as compared to initial results. Direct comparison between CHEM and gelatin sponge embolization was performed in only 2 animals, precluding any conclusion, but we could not demonstrate a significant difference in angiographic or pathological findings at 3 months.

All Imax embolized with CHEM blocks were completely occluded at 3 weeks. The lack of recanalization in this arterial occlusion model contrasts with the one found with platinum coil occlusion in the same model [34]. This difference can be simply explained: arteries implanted with coils are occluded by thrombus that can be recanalized; whereas the embolic agent can occupy the entire vascular space when CHEM is used to occlude the artery.

One way to design endovascular treatment with CHEM would be to modify the Tg, so that the embolic agent would increase in volume at body temperature in order to completely fill the aneurysmal cavity, without residual necks and with a lesser amount of thrombus to be recanalized.

4.6. CONCLUSION

CHEM is a new non-cytotoxic, non-mutagenic, and poorly thrombogenic polyurethane that could be used as a material for endovascular procedures. Its porosity permits cellular invasion and secondary neointima formation. CHEM could achieve permanent occlusion of arteries, where it completely filled the vascular lumen. In some cases, CHEM embolization of aneurysms led to residual necks and recurrences. This is probably because its current formulation does not permit to completely fill the lumen of treated aneurysms. In general, CHEM embolization led to improve angiographic scores at 3 weeks as compared to initial results. Other properties of the material, such as shape memory and the possibility of modifying the Tg or the size of the pores, are promising for the design of new tools, including embolic agents that could completely replace the aneurysmal cavity, without intervening thrombus, to prevent recanalization and recurrences after endovascular treatment of aneurysms. Future experimental work needs to be performed to determine the exact formulation that would permit insertion into small catheters and controlled recovery of a predetermined shape into a specific site.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Rosy Eloy (Biomatech) for the mutagenicity and cytotoxicity testing. This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council, and Medical Research Council of Canada.

4.7. REFERENCES

1. Vignali C, Cioni R, Neri E, Petruzzi P, Bargellini I, Sardella S, Ferrari M, Caramella D, Bartolozzi C. Endoluminal treatment of abdominal aortic aneurysms. *Abdom Imaging* 2001;26(5):461-468.
2. Murayama Y, Vinuela F, Duckwiler G, Gobin YP, Guglielmi G. Embolization of incidental aneurysms by using the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg.* 1999;90:207-214.
3. Ng P, Khangure MS, Phatouros CC, Bynevelt M, ApSimon H, McAuliffe W. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with Guglielmi detachable coils: Analysis of midterm angiographic and clinical outcomes. *Stroke* 2002; 33: 210-217.
4. Raymond J, Roy D. Safety and efficacy of endovascular treatment of acutely ruptured aneurysms. *Neurosurgery* 1997;41(6):1235-1246.
5. Raymond J, Desfaits AC, Roy D. Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke* 1999;30:1657-1664.
6. Patterson MA, Jean-Claude JM, Crain MR, Seabrook GR, Cambria RA, Rilling WS, Towne JB. Lessons learned in adopting endovascular techniques for treating abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg* 2001;136:627-634.
7. Mottu F, Gailloud P, Massuelle D, Rufenacht DA, Doelker E. In vitro assessment of new embolic liquids prepared from preformed polymers and water-miscible solvents for aneurysm treatment. *Biomaterials* 2000;21(8):803-811.
8. Murayama Y, Vinuela F, Tateshima S, Song JK, Gonzalez NR, Wallace MP. Bioabsorbable polymeric material coils for embolization of intracranial aneurysms: a preliminary experimental study. *J Neurosurg* 2001;94(3):454-463.
9. Oowaki H, Matsuda S, Sakai N, Ohta T, Iwata H, Sadato A, Taki W, Hashimoto N, Ikada Y. Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery. *Biomaterials* 2000;21(10):1039-1046.

10. Robin J, Martinot S, Curtil A, Vedrinne C, Tronc F, Franck M, Champsaur G. Experimental right ventricle to pulmonary artery discontinuity: outcome of polyurethane valved conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115(4):898-903.
11. Wabers HD, Hergenrother RW, Coury AJ, Cooper SL. Thrombus deposition on polyurethanes designed for biomedical applications. *J Appl Biomater* 1992;3(3):167-176.
12. Wheatley DJ, Raco L, Bernacca GM, Sim I, Belcher PR, Boyd JS. Polyurethane: material for the next generation of heart valve prostheses? *Eur J Cardiothorac Surg* 2000 ;17(4) :440-448.
13. Wallin RF, Arscott EF. A Practical Guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *MDDI*, Apr 1998 ; 96-98.
14. Johnson GM, Upman PJ, Wallin RF. A Pratical Guide to ISO 10993-3: Genotoxicity. *MDDI* 1998: p.93.
15. German WJ, Black SPW. Experimental production of carotid aneurysms. *New England J Med* 1954;250(3):104-106.
16. Desfaits AC, Raymond J. Growth factors stimulate neointimal cells in vitro and increase the thickness of the neointima formed at the neck of porcine aneurysms treated by embolization. *Stroke* 2000;31:498-507.
17. Raymond J, Venne D, Allas S, Roy D, Oliva VL, Denbow N, Salazkin I. Healing mechanisms in experimental aneurysm. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol* 1999;26:7-20.
18. Lugmayr HF, Holzer H, Kastner M, Rieldelsberger H, Auterith A. Treatment of complex arteriosclerotic lesions with Nitinol stents in the superficial femoral and popliteal arteries: A midterm follow-up. *Vascular and Interventional Radiology* 2002; 222: 37-43.
19. Konya A, Maxin M, Wright KC. New embolization coil containing a Nitinol wire core: preliminary in vitro and in vivo experiences. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12(7):869-877.

20. Tobushi H, Hayashi S, Kojima S. Mechanical properties of shape memory polymer of polyurethane series. *JSME Int Journal* 1993;1(35):296-302.
21. Hayashi S, Ishikawa N, Giordano C. High moisture permeability polyurethane for textile applications. *Proceeding of SPI/SOPA Polyurethane World Congress (Div. 35th Annual Cong.)*, Vancouver, B.C. Canada. 1993 :400-404.
22. Lendlein A, Schmidt AM, Langer R. AB-polymer networks based on oligo(ϵ -caprolactone) segments showing shape-memory properties. *PNAS* 2001;98:842-847.
23. Hayashi S, Shirai Y. Shape Memory Polymer: Properties. *Mitsubishi Techn Bull* December 1988; no.184.
24. Sokolowski W. CHEM expandable structures. *Proceeding of 2nd National Space Inflatable Workshop*, Pasadena, CA, May 20-21, 1998. p.105-108.
25. Sokolowski W, Chmielewski A. Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) expandable structures. *NASA Tech Briefs*, February 1999. p. 56-57.
26. Sokolowski W, Chmielewski A, Awaya H. Solar heating for deployment for CHEM foam structures. *NASA Tech Briefs*, October 2001. p. 36-37.
27. Sokolowski W, Chmielewski A, Hayashi S, Yamada T. Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) self-deployable structures. *Proceeding of SPIE International Symposium on Smart Structures and Materials*, Vol.3669, 1-5 March 1999, Newport Beach, CA. p.179-185.
28. Watt A., Pellegrino S, Sokolowski W. Thermo-mechanical properties of a shape memory polymer foams. To be published in *Institute of Physics, Journal of Smart Materials and Structures*.
29. Raymond J, Leblanc P, Desfaits AC, Salazkin I, Morel F, Janicki C, Roorda S. In situ beta radiation to prevent recanalization after coil embolization of cerebral aneurysms. *Stroke* 2002;33:421-427.
30. Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 1999;14(1):67-90.
31. Schwartz RS, Holmes DR Jr, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 1992;20(5):1284-93.

32. Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, Brazeau P. Healing of experimental aneurysms, II: platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol* 1999;26:92-100.
33. Pasic M, Müller-Glauser W, Odermatt B, Lachat M, Seifert B, Turina M. Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small diameter Dacron grafts. *Circulation* 1995;92:2605-2616.
34. Tamatani S, Ozawa T, Minakawa T, Takeuchi S, Koike T, Tanaka R. Radiologic and histopathologic evaluation of canine artery occlusion after collagen-coated platinum microcoil delivery. *Am J Neuroradiol*. 1999 Apr;20(4):541-54

CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1. LE CHEM COMME AGENT EMBOLISANT

Les matériaux à mémoire de forme, dits « intelligents », comme le CHEM , sont des 'matériaux multifonctionnels capables de s'adapter à leur environnement' (De Rosnay, 2000). Ils sont de plus en plus utilisés dans la confection de dispositifs minimalement invasifs. Le Nitinol, par exemple, sert déjà à la fabrication de stents (Palmaz *et al.* 1987), stent-grafts (Cragg et Dake, 1993; Parodi, Palmaz et Barone, 1991), de clips pour le traitement chirurgical des anévrismes intracrâniens (Lipscomb et Nokes, 1996), de filaments d'orthodontie (Thompson, 2000), de filtres de la veine cave inférieure (Simon *et al.* 1977; Poletti *et al.* 1998; Barras et Myers, 2000) et d'agrafes pour la fixation interne de fractures osseuses (Lipscomb et Nokes, 1996; Dai, Hou et Sun, 1993). Le CHEM est un polymère à mémoire de forme ; il présente certains avantages par rapport aux alliages comme le Nitinol: il possède une densité plus faible, un retour de déformation plastique beaucoup plus élevé et sa fabrication est plus simple et à meilleur coût (Tobushi, Hayashi et Kojima, 1993; Hayashi, Ishikawa et Giordano, 1993).

Le CHEM présente une structure spongieuse. Les PMF solides à base de polyuréthane utilisés pour obtenir la structure cellulaire ouverte du CHEM sont uniques par les grands changements du module d'élasticité (résistance à l'étirement et à la compression) qu'ils montrent au-dessus et au-dessous de la T_g . Une grande quantité de déformation plastique (déformation irréversible) (jusqu'à 400%) peut être regagnée par chauffage. Le changement réversible du module d'élasticité entre les états vitreux et élastiques des polymères peut atteindre un facteur de 500. Les structures à base de CHEM sont à auto-déploiement, utilisant les propriétés de mémoire de forme combinées au retour élastique (« spring back ») de l'éponge. La configuration spongieuse assure des vitesses de déploiement supérieures, une meilleure précision dans le retour à la forme originale et un rapport volume expansé/volume comprimé plus élevé comparé aux PMF solides

(Sokolowski et Chmielewski, 1999). En pratique (laboratoires de la NASA), les éponges de CHEM peuvent être compactées en petits volumes (1-20 dans une direction) au-dessus de leur T_g et peuvent ensuite être entreposées sous leur T_g , sans application d'une force externe. Une augmentation de la température au-dessus de leur T_g occasionne un retour à la forme originale. Les structures ainsi obtenues, lorsque comprimées et entreposées sous leur T_g , sont légères (poids d'un ordre de grandeur de 2 fois inférieur comparé à l'aluminium) et n'occupent qu'une fraction de leur volume original. Toutes ces propriétés, en plus de sa porosité naturelle, confèrent au CHEM un potentiel d'utilisation comme agent embolisant, autant comme matériau de remplissage (pour occlure les anévrismes par exemple), que comme composant de dispositifs d'embolisation à auto-déploiement. Par contre, le CHEM, contrairement au Nitinol, ne pourrait servir pour la fabrication de clips, de filaments d'orthodontie, d'agrafes ou de filtres. La haute porosité du CHEM ne permettrait pas d'en faire des filaments, à moins d'en changer les caractéristiques afin d'obtenir des pores extrêmement petits.

La mémoire de forme est d'un grand intérêt dans le traitement endovasculaire des anévrismes. Ces techniques nécessitent l'emploi de matériaux pouvant être miniaturisés et insérés au sein de petits cathéters, pour ensuite, lorsque sur place, prendre de l'expansion afin d'occlure et/ou d'exclure l'anévrisme de la circulation. Cette mémoire de forme permet de conserver le dispositif sous forme comprimée, à la température de la pièce, et cela jusqu'à ce qu'il serve d'agent embolisant. La T_g peut être sélectionnée selon les besoins, entre -100°C et $+80^{\circ}\text{C}$; elle pourrait donc être légèrement inférieure à celle du corps si l'application le nécessitait. Par exemple, dans le cas d'une application endovasculaire, sous sa forme comprimée, le CHEM pourrait être délivré à l'intérieur d'un vaisseau, via un cathéter. Lorsqu'il est mis en place, le CHEM comprimé pourrait être poussé hors du cathéter, où il prendrait de l'expansion lors de son réchauffement par la température du sang, légèrement au-dessus de sa T_g , et ainsi, remplir complètement la cavité anévrismale, sans collet résiduel et en minimisant le thrombus sujet à la recanalisation.

5.2. BIOCOMPATIBILITÉ *IN VITRO*

L'utilisation de nouveaux matériaux en implantologie est souvent empirique et s'effectue par essais et erreurs. Ces matériaux ont été conçus pour des applications industrielles et leurs caractéristiques mécaniques et physico-chimiques sont parfois mal adaptées aux besoins (Laroche, 1997). Ainsi, le CHEM a été développé pour des applications aérospatiales. Nous avons envisagé pour la première fois une application médicale; tout était donc à faire.

Si le CHEM présentait à première vue des caractéristiques favorables à son utilisation endovasculaire, plusieurs évaluations préliminaires demeuraient nécessaires avant d'envisager une application biomédicale. Avant tout, il a fallu démontrer la biocompatibilité du matériau. Comme les polyuréthanes en général sont reconnus biocompatibles, nous nous attendions à une réponse favorable (Zdrahala et Zdrahala, 1999). Les polyuréthanes sont largement utilisés dans la confection de dispositifs destinés à être en contact avec le sang, en raison de leur faible thrombogénicité (Wabers *et al.* 1992; Robin *et al.* 1998; Wheatley *et al.* 2000). De plus, des tests thermomécaniques favorables avaient déjà été effectués sur ce même produit (Watt, Pellegrino et Sokolowski, Sous Presse). Nous avons démontré que l'extrait de CHEM ne montrait aucune évidence de cytotoxicité ou de mutagénicité. Le CHEM est donc un polymère biocompatible, d'après ces tests standardisés (CSA, 1984), effectués par Biomatech. On peut cependant s'interroger sur la méthodologie standard utilisée pour tester ce genre de biomatériau. En effet, les normes prescrivent l'utilisation d'extraits aqueux de matériau. Par conséquent, ces « extraits » de CHEM ont été utilisés pour effectuer les tests, alors que le CHEM n'est pas miscible dans l'eau. Ces extraits ne mettraient donc pas directement en contact le CHEM avec les cellules et testeraient seulement les débris, agents contaminants et autres produits solubles dans l'eau.

Selon les normes standardisées, d'autres tests restent à faire : tests d'hémolyse, thrombogénicité, pyrogénicité, toxicité systémique, injections intracutanées, sensibilisation de la peau et implantation intramusculaire (CSA, 1984 ; ASTM, 1998).

5.3. ÉTUDES *IN VIVO*

Un matériau s'avérant biocompatible *in vitro* ne l'est pas forcément *in vivo* et vice versa. Par exemple, les tests *in vitro* ne mettent pas en jeu le film superficiel, formé *in vivo*, permettant la régularisation de l'attachement cellulaire à l'implant et ils ne prennent pas en compte les effets des produits de dégradation apparaissant *in vivo* après contact du matériau avec les enzymes interstitielles et cellulaires (Wise, 2000).

Pour évaluer la valeur potentielle du CHEM comme agent embolisant, nous avons procédé à des expériences *in vivo*, à l'aide d'un modèle d'anévrismes latéraux carotidiens canins. Ce modèle est fréquemment utilisé au sein de notre laboratoire (Raymond, Desfaits et Roy, 1999; Desfaits et Raymond, 2000; Raymond, Venne, Allas *et al.* 1999). Il permet d'évaluer la thrombogénicité du matériau, la réaction inflammatoire engendrée par sa présence *in vivo*, ainsi que son habileté à supporter une invasion de tissu néointimal, essentiel au phénomène de guérison vasculaire (Schwartz, Holmes et Topol, 1992). Nous avons contourné le problème de la livraison par cathéter en procédant à l'embolisation par voie chirurgicale. Les blocs de CHEM ont donc été soigneusement déposés dans les anévrismes, immédiatement après la création de ceux-ci. Grâce à cette technique chirurgicale, ces propriétés ont pu être évaluées sans qu'il soit nécessaire de développer la forme finale de l'agent, qui doit rencontrer les besoins mécaniques spécifiques afin d'être inséré dans de petits cathéters et délivré de manière contrôlée.

Les anévrismes traités à l'aide du CHEM ont montré les signes d'une guérison, avec la formation d'une néointima épaisse, ainsi qu'un envahissement cellulaire abondant de la

mousse de polyuréthane. Les observations angiographiques ont pu servir à montrer une amélioration significative ($p < 0,013$) des résultats à 3 semaines, comparé aux résultats initiaux. Certains anévrismes ont montré de petites fentes de recanalisation. La porosité intrinsèque du CHEM a contribué à cette guérison. En général, les polymères doivent être sculptés pour devenir des matériaux poreux, afin de pouvoir supporter la croissance d'un tissu de granulation et la formation d'une néointima au niveau de la partie luminale des implants vasculaires. Les polymères synthétiques ne possèdent pas de sites de liaison naturels. Par conséquent, l'adhésion cellulaire se fait habituellement par l'intermédiaire des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) adsorbées à leur surface ou, dans le cas présent, à l'intérieur même des pores. Le dépôt de fibrine durant la formation du thrombus à la surface et à l'intérieur des pores du CHEM fournit une matrice provisoire essentielle à l'invasion cellulaire au collet des anévrismes traités (Raymond, Desfaits et Roy, 1999). Les CMLV, ou myofibroblastes, migrent à l'intérieur de cette matrice provisoire, sécrétant collagène et protéoglycanes, formant la néointima, laquelle, idéalement, scellera le collet de l'anévrisme.

La porosité pourrait être ajustée aux besoins de l'application : dans le cas des anévrismes, de plus petites cavités interconnectées permettraient toujours la migration cellulaire, sans toutefois favoriser l'accumulation d'un thrombus excessif sujet à la recanalisation. Le caillot, par ailleurs important pour la guérison des anévrismes puisqu'il sert de matrice résorbable pour la croissance cellulaire, fournit des sites potentiels à la recanalisation, souvent impliqués dans les récives (Raymond, Leblanc, Desfaits *et al.* 2002).

Des pores de 0.2 microns de diamètre préviendraient la migration des CMLV (Betz *et al.* 1991), ce qui nous indique qu'il faut éliminer cet ordre de grandeur. Les expériences de migration des CMLV se font avec des pores de 5 ou 8 microns (Betz *et al.* 1991; Fallier-Becker *et al.* 1991; Dubey, Jackson et Luscher, 1995), alors que certaines études

ont montré une bonne croissance des CMLV avec des pores autour de 107 μm (Zeltinger *et al.* 2001).

Bien que la formation d'un thrombus soit essentielle à la formation néointimale, une thrombogénicité excessive peut causer des complications thromboemboliques. De façon similaire, un agent embolisant favorisant la formation néointimale favorise la guérison des anévrismes, mais une néointima trop épaisse pourrait causer une sténose du vaisseau porteur. Avec le CHEM, le fait que les collets résiduels présents immédiatement après embolisation demeuraient persistants à 3 semaines suggère que la thrombogénicité du matériau était minimale et que la formation néointimale n'était pas suffisamment hypertrophique pour refermer ces espaces résiduels et encore moins le vaisseau porteur. Par ailleurs, le CHEM n'a pas provoqué de réaction inflammatoire excessive *in vivo*, comparé à la réaction modérée causée dans le même modèle par l'éponge de gélatine (Gelfoam®), un agent embolisant classique utilisé en clinique depuis des décennies, (Desfaits et Raymond, 2000).

Le phénomène de recanalisation est quasi-universel. On le retrouve dans tous les modèles d'occlusion endovasculaire et avec pratiquement tous les agents embolisants. Ce phénomène se produit tout particulièrement lors de l'embolisation à l'aide de spires métalliques, où l'on peut retrouver une recanalisation au pourtour de la masse de spires, mais aussi en son sein, entre les spires. Par contre, le processus de recanalisation ne s'est produit qu'entre la masse du CHEM et la paroi vasculaire, et non en son centre; un peu comme ce qui a pu être observé avec le copolymère éthylène/alcool vinylique (Raymond, Salazkin, Metcalfe *et al.* Sous presse, *AJNR*). Après 3 semaines ou 3 mois certains anévrismes traités à l'aide de CHEM présentaient des fentes de recanalisation, sous forme de croissants, à l'interface CHEM/paroi anévrismale. Ces fentes prenaient naissance au collet et descendaient plus ou moins profondément dans la cavité anévrismale, vers le fundus.

Dans le processus de recanalisation, alors que les CMLV ou myofibroblastes envahissent le thrombus afin de sécréter du collagène, les cellules endothéliales (CE) migrent à la surface du thrombus, maintenant une surface non-thrombogène et re-perméabilisant les « coins » de l'anévrisme. Ce phénomène de recanalisation cellulaire du thrombus, lié à une endothélialisation rapide, a pu être démontré dès les premières semaines après embolisation (Raymond, Leblanc, Desfaits *et al.* 2002). Ce phénomène physiologique est fondamentalement important pour un retour à l'intégrité vasculaire après occlusion artérielle, mais pourrait être responsable des récurrences après traitement endovasculaire des anévrismes.

L'embolisation au Gelfoam®, dans le même modèle, conduit à des collets résiduels qui augmentent à 3 semaines (Raymond, Desfaits et Roy, 1999). En revanche, l'embolisation à l'aide de CHEM mène à une amélioration des scores angiographiques à 3 semaines. Malheureusement, une comparaison directe entre l'embolisation à l'aide du CHEM et du Gelfoam® n'a été faite que chez 2 animaux, empêchant toute conclusion. Maintenant que nos expériences préliminaires *in vivo* à court et moyen terme ont montré des résultats satisfaisants, il y a lieu d'effectuer des expériences à plus long terme, afin d'évaluer les risques de récurrence associés au CHEM. L'utilisation d'anévrismes canins de bifurcation, en plus des anévrismes latéraux, serait aussi pertinente afin de permettre une meilleure évaluation du CHEM, puisque ces anévrismes expérimentaux imitent mieux les anévrismes humains et ont une plus forte propension à la récurrence (Raymond, Berthelet, Desfaits *et al.* 2002).

Des essais de livraison transcathéter ont également été effectués. Contrairement aux anévrismes, les artères maxillaires embolisées à l'aide du CHEM étaient complètement occluses à 3 semaines. Elles n'étaient sujettes à aucune recanalisation, contrairement à ce qui peut être observé lorsque cette même occlusion est faite à l'aide de spires de platine (Tamatani *et al.* 1999). Cette différence peut s'expliquer facilement par le fait que les artères embolisées à l'aide de spires sont occluses par du thrombus qui peut être

recanalisé, alors que, du côté du CHEM, celui-ci occupe le diamètre complet du vaisseau. Il s'agit donc d'un avantage, au moins théorique, qui permettrait de minimiser les échecs initiaux et la recanalisation. De la même façon, le CHEM pourrait servir d'agent de remplissage entre la paroi des anévrismes fusiformes de l'aorte abdominale et le stent-graft, afin de minimiser les fuites périprothétiques, la recanalisation et les récidives.

5.4. DIFFICULTÉS LIÉES À L'UTILISATION DU CHEM COMME AGENT EMBOLISANT

Le CHEM pourrait devenir une alternative intéressante aux spires métalliques, mais seulement si l'on pouvait le comprimer de façon spectaculaire et efficace.

Les essais de livraison transcathéter montrent qu'il serait essentiel de mettre au point le système de compression mécanique des échantillons de CHEM. Ce dispositif permettrait l'abaissement de la température, tout en maintenant la force de compression, et ce, jusqu'à ce que la forme soit fixée, c'est-à-dire jusqu'à ce que la température soit sous la T_g . La compression manuelle s'avère difficile à faire en respectant les températures nécessaires à sa compaction et à son entreposage. Avec les moyens dont nous disposons, l'insertion de l'éponge fut un défi difficile à relever, et ce, malgré l'utilisation de cathéters de gros calibre, alors que le traitement des anévrismes intracrâniens nécessite l'utilisation de « micro » cathéters dont le diamètre externe (DE) n'excède pas 1mm. On a pu obtenir un pourcentage de compaction ((taille expansé/comprimé)*100) de seulement 300-400 % alors que l'on s'attendait à beaucoup plus. De plus, la friction à l'intérieur du cathéter était excessive, nuisant au déplacement de l'éponge. Le CHEM s'est aussi avérée trop friable à l'état vitreux. Il pourrait se fragmenter s'il devait être soumis à des contraintes de cisaillement. Cette fragmentation partielle pourrait occasionner la formation de débris et d'embolies. Il serait donc utile de recouvrir le CHEM d'un agent de recouvrement (dégradable ou non) permettant

d'abaisser le coefficient de friction engendré par le passage du CHEM dans le cathéter. Ce recouvrement permettrait ainsi de diminuer la friabilité du CHEM et de faciliter son passage dans les cathéters et vaisseaux tortueux.

La mémoire de forme dépendante de la température est l'un des aspects les plus intéressants de l'utilisation du CHEM en médecine. Par contre, il présente aussi un inconvénient puisque la plupart des méthodes de stérilisation utilisées dans les hôpitaux impliquent la chaleur, en combinaison ou non, avec d'autres produits. La stérilisation à l'oxyde d'éthylène (EtO) pose problème. La température demeure trop basse pour dénaturer le polymère, mais encore suffisante pour provoquer le déploiement des éponges. Si la T_g choisie est de 37°C, la température de stérilisation provoquera une expansion des blocs à l'intérieur des introducteurs et nuira au transfert dans les cathéters. De plus, les polyuréthanes auraient une plus grande affinité pour l'absorption et la rétention des résidus d'EtO que les autres matériaux, nécessitant une période d'aération supplémentaire, parfois à haute température (Chamberlain, Lambert et Tang, 1999). L'irradiation aurait pu présenter une alternative de stérilisation à basse température, mais celle-ci présente d'autres dangers d'altération du polymère (force, résistance, friabilité) et n'est pas aussi disponible. La stérilisation au plasma est envisageable, mais elle pourrait causer une érosion et n'assurerait pas la stérilisation jusque dans les pores du polymère.

5.5. APPLICATIONS POTENTIELLES ET TRAVAUX FUTURS

Les fuites péri-prothétiques minent l'efficacité du stent-graft dans le traitement des anévrismes aortiques. Une solution potentielle à ces fuites et, peut-être aussi à la migration, serait le remplissage de la cavité anévrismale par un polymère déposé en dehors du *graft*. Le CHEM pourrait ainsi trouver une application plus facile dans le traitement des anévrismes de l'aorte que dans celui des anévrismes cérébraux puisque le calibre des cathéters utilisés est beaucoup plus important. Le CHEM pourrait ainsi

remplir complètement l'espace présent entre le stent-graft et la paroi de l'anévrisme et engendrer une occlusion permanente par l'invasion cellulaire qui s'en suit. Il pourrait aussi éliminer les fuites péri-prothétiques de type I et II et améliorer les résultats à court et long terme du traitement endovasculaire. Ce remplissage pourrait aussi constituer une solution à la migration potentielle du stent-graft en engendrant une fixation mécanique (le stent-graft serait fixé au CHEM, épousant le plus possible la forme de l'anévrisme et s'y retrouvant en quelque sorte « coincé ») et ensuite biologique, par incorporation cellulaire.

Il faut dès maintenant envisager les modifications nécessaires pour faire du CHEM un agent embolisant réaliste. Pour le traitement endovasculaire des anévrismes, la formulation que nous avons utilisée n'est pas optimale : les pores s'avèrent trop volumineux, de disposition et de tailles non-uniformes, et le degré de compaction est insuffisant pour permettre la livraison par microcathéters.

Un design intéressant serait une « spire modifiée ». Les spires de platine présentent de grands avantages par rapport aux autres dispositifs, comme leur radio-opacité, leur petit diamètre leur permettant d'être délivrées à l'aide des cathéters les plus petits, et surtout, la possibilité de les récupérer si elles sont mal placées. C'est donc dans cette optique qu'une nouvelle spire, combinée à un hydrogel expansif, a été développée et testée (Kallmes et Fujiwara, 2002) (figure 5.1). Une telle application pourrait être envisagée pour le CHEM.

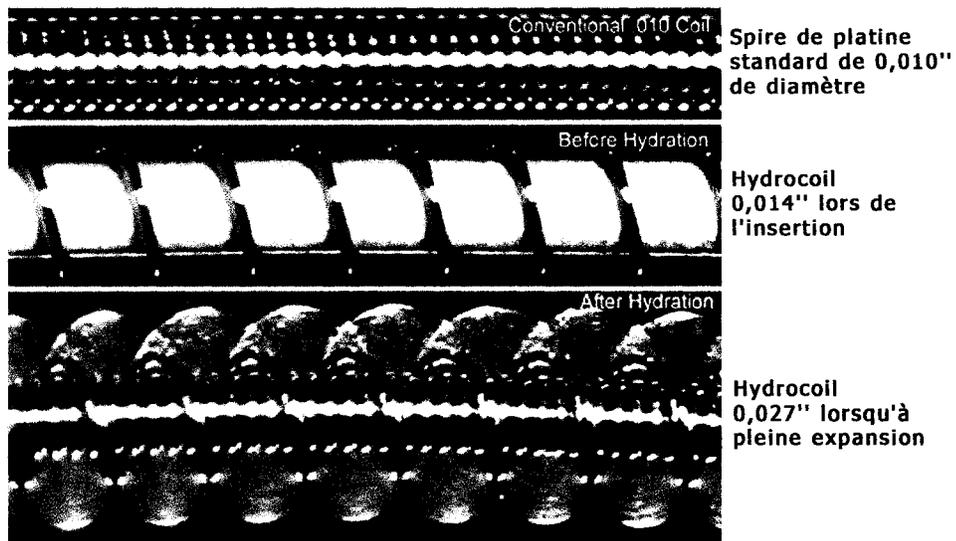


Figure 5.1. Hydrocoil®, MicroVention, CA, USA. Lorsqu'il est introduit dans l'anévrisme, l'hydrogel présent autour de la spire prend de l'expansion, permettant un remplissage plus complet de l'anévrisme entre les spires et empêche du même coup l'accumulation de grandes quantités de sang.

CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le CHEM est un polyuréthane non cytotoxique, non mutagène et peu thrombogène qui pourrait être utilisé comme matériau d'embolisation endovasculaire. Sa porosité permet une invasion cellulaire et une formation néointimale secondaire. En général, l'embolisation à l'aide de CHEM a mené à l'amélioration des résultats angiographiques à 3 semaines, comparé aux résultats initiaux et n'a pas conduit à des récurrences significatives à 3 mois. D'autres propriétés du CHEM, telles que la mémoire de forme ou la possibilité de modifier sa T_g ou la taille de ses pores, sont prometteuses pour l'élaboration de nouveaux dispositifs endovasculaires. Ces dispositifs incluent des agents emboliques pouvant remplacer complètement la cavité anévrismale, sans l'intervention du thrombus, prévenant ainsi la recanalisation et les récurrences après traitement endovasculaire des anévrismes. Des travaux expérimentaux seront nécessaires afin de déterminer la formulation exacte du CHEM permettant son insertion dans des petits cathéters et un retour contrôlé à une forme prédéterminée dans un site spécifique, ainsi que sur le potentiel du CHEM à diminuer les risques de récurrences des anévrismes à long terme.

Une vision futuriste du traitement des anévrismes à l'aide du CHEM pourrait suivre ce scénario : avant intervention, les techniques d'imagerie serviraient à la reconstruction tridimensionnelle de la taille et de la forme de l'anévrisme. Le CHEM serait alors sculpté afin d'avoir les proportions correspondant à celles de l'anévrisme, pour réaliser un remplissage le plus complet possible. Le CHEM serait alors compacté et conservé ainsi jusqu'à l'intervention. Il serait aussi possible d'avoir recours à un moulage par injection (Watt, Pellegrino et Sokolowski, sous presse), permettant l'obtention de formes complexes, ou à une technique de micro-architecture assistée par ordinateur (Giordano *et al.* 1996; Nakayama *et al.* 2000; Zeltinger *et al.* 2001).

La structure spongieuse du CHEM rend possible son utilisation comme véhicule de transport de molécules, de cellules ou même de support pour délivrer une radiation locale. En effet, notre équipe a déjà montré que la bêta-radiation, après embolisation, inhibe la recanalisation et pourrait améliorer les résultats à long terme du traitement endovasculaire des anévrismes (Raymond, Sauvageau, Salazkin *et al.* 2002).

Le CHEM pourrait servir de véhicule de transport pour des greffes cellulaires (figure 6.1). Celles-ci permettraient une thérapie génique *ex-vivo*, une technologie qui permettrait la surexpression d'une multitude de gènes potentiellement utiles à la guérison (Desfaits et Raymond, 2000). Encore là, il serait nécessaire de modifier la formulation du CHEM, qui s'est révélé, lors de travaux préliminaires, peu propice à une adhésion cellulaire *in vitro*.

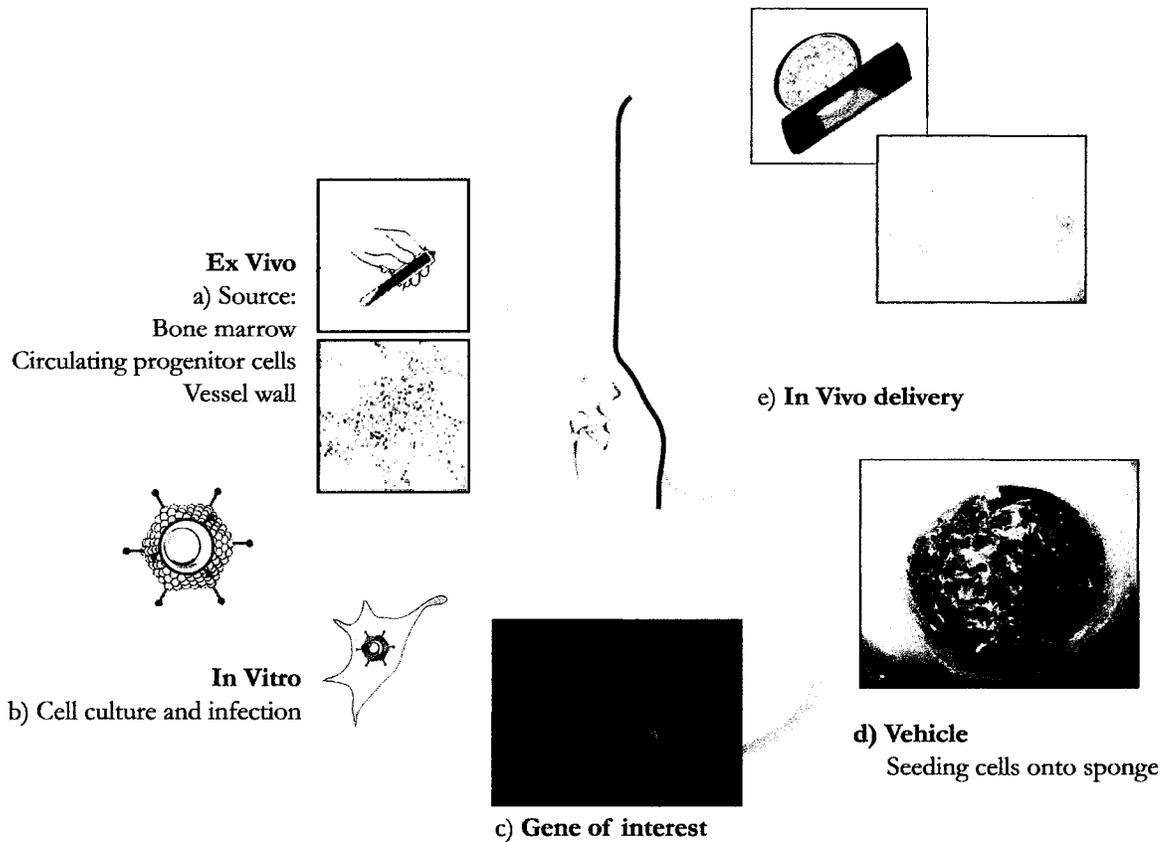


Figure 6.1. Thérapie génique ex-vivo. Le CHEM pourrait être utilisé comme véhicule de transport de cellules ayant subi une transfection.

Les facteurs de croissance impliqués dans la formation néointimale (Desfaits et Raymond, 2000) pourraient également être transportés et délivrés par le CHEM, comme nous l'avons proposé pour l'alginate. Le PDGF-BB et le TGF β -1 ont l'habileté de stimuler la croissance des cellules néointimales *in vitro* et la formation néointimale *in vivo* (Desfaits et Raymond, 2000). Le TGF β -1 est un important stimulateur de production de collagène. Il peut également inhiber la migration endothéliale associée à la recanalisation (Ribourtout *et al.* Sous presse). L'alginate s'est révélé un agent

embolique difficile à contrôler parfois responsable d'embolies. Ici aussi, la formulation devra être modifiée afin d'augmenter la sécurité de l'agent (Annexe 1).

Le poloxamère est aussi un agent embolisant transitoire permettant des occlusions de quelques minutes qui pourraient servir, par exemple, à réaliser une livraison locale plus efficace de médicaments ou de gènes, en toute sécurité (Annexe 2).

Comme on peut le constater, les biomatériaux voient leur rôle rapidement évoluer, d'un outil aux vertus purement biomécaniques, vers des fonctions de support à des interventions biomoléculaires de plus en plus sophistiquées dans le traitement des anévrismes (Raymond, Desfaits et Roy, 1999).

BIBLIOGRAPHIE

Abruzzo T, Cloft HJ, Marek M, Shengelaia GG, Snowhill PB, Waldrop SM, Sambanis A. Interaction of vascular smooth muscle cells with collagen-impregnated embolization coils studied with a novel quantitative in vitro model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002 Apr;23(4):674-681.

Abruzzo T, Cloft HJ, Shengelaia GG, Waldrop SM, Kallmes DF, Dion JE, Constantinidis I, Sambanis A. *In vitro* effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres. *Radiology*. 2001 Aug;220(2):428-435.

Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 1997 May;25(5):916-926.

Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA, Kallmes DF. 1999 ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol*. 2000 Feb;174(2):349-354.

ANAES. 2000. Anévrismes intracrâniens rompus : occlusion par voie endovasculaire *versus* exclusion par microchirurgie. [En ligne]. ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé. 10p. SY_ASSI-57JE5J. [http://www.anaes.fr/anaes/Publications.nsf/nPDFFile/SY_ASSI-57JE5J/\\$File/anevsynth.pdf?OpenElement](http://www.anaes.fr/anaes/Publications.nsf/nPDFFile/SY_ASSI-57JE5J/$File/anevsynth.pdf?OpenElement) (Page consultée le 22 avril 2003)

Arko FR, Hill BB, Olcott C, Harris EJ, Fogarty TJ, Zarins CK. Endovascular repair reduces early and late morbidity compared to open surgery for abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Ther.* 2002 Nov-Dec;9(6):711-718.

Armstrong JK, Meiselman HJ, Fisher TC. Inhibition of red blood cell-induced platelet aggregation in whole blood by a nonionic surfactant, poloxamer 188 (RheothRx injection). *Thromb Res.* 1995 Sep 15;79(5-6):437-450.

ASTM. 1998. F748-98 Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices. American Society for Testing and Materials (ASTM), West Conshohocken, PA, USA. 7p.

Ballet AC, Guerin J, Berge J, Taboulet F, Martin S, Philip V, Saux MC, Woronoff-Lemsi MC. Neurosurgical and endovascular treatment of intracranial aneurysms: a cost analysis of two different strategies at the University Hospital of Bordeaux (France). *Neurochirurgie* 2002 Nov;48(5):419-425.

Barth A. Hémorragie sous-arachnoïdienne sur rupture d'anévrisme. Groupe Suisse De Travail Pour Les Maladies Cérébro-Vasculaires et Fondation Suisse De Cardiologie. *Bulletin des Médecins Suisses.* 2000;81(45) : 2535-2544.

Becker TA, Kipke DR, Preul MC, Bichard WD, McDougall CG. In Vivo Assessment of Calcium Alginate Gel for Endovascular Embolization of a Cerebral Arteriovenous Malformation Model Using the Swine Rete Mirabile. *Neurosurg* 2002; 51(2):453-459.

Bernhard VM, Mitchell RS, Matsumura JS, Brewster DC, Decker M, Lamparello P, Raithel D, Collin J. Ruptured abdominal aortic aneurysm after endovascular repair. *J Vasc Surg.* 2002 Jun;35(6):1155-1162. Review.

Betz E, Fallier-Becker P, Wolburg-Buchholz K, Fotev Z. Proliferation of smooth muscle cells in the inner and outer layers of the tunica media of arteries: an in vitro study. *J Cell Physiol.* 1991 Jun;147(3):385-395.

Blonder JM, Baird L, Fulfs JC, Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *Life Sci.* 1999;65(21):PL261-266.

BME. 2003. Biomaterial Biocompatibility and the Macrophage. In. *University of Memphis & University of Tennessee Joint program in Biomedical Engineering (BME)*. <http://memphis.mecca.org/bme/> (Page consultée le 16 juin 2003)

Byrne JV, Hope JKA, Hubbard N, Morris JH. The nature of thrombosis induced by platinum and tungsten coils in saccular aneurysms. *Am J Neuroradiol.* 1997 Jan;18:29-33.

Cabana A, Abdellatif AK, Juhász J. Study of the gelation process of polyethylene oxide_a-polypropylene oxide_b-polyethylene oxide_a copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1997;190:307-312.

Carr ME Jr, Carr SL, High AA. Effects of poloxamer 407 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Mar;7(2):109-113.

Carr ME Jr, Powers PL, Jones MR. Effects of poloxamer 188 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Thromb Haemost.* 1991 Nov 1;66(5):565-568.

Cenni, Arciola, Ciapetti *et al.* 2000 In. Wise DL. *Biomaterials and Bioengineering Handbook*. Marcel Dekker, Inc.. New York, NY, USA. 920 p.

Chaplin M, 2003. Alginate. London South Bank University. In. Water Structure and Behavior. [En ligne]. (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyalg.html>). Page consultée le 26 novembre 2003.

Chinn JA, Slack, SM. Biomaterials: Protein-Surface Interactions. *The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition*. Ed. Joseph D. Bronzino. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

Chmielewski A, Sokolowski W, Rand P. Lightweight, Self-Deployable Wheels. NASA Tech Briefs, February 2003: p.10.

Coutard M, Huang W, Osborne-Pellegrin M. Heritability of intracerebral hemorrhagic lesions and cerebral aneurysms in the rat. *Stroke* 2000 Nov;31(11):2678-2684.

Cragg AH, Dake MD. Percutaneous femoropopliteal graft placement. *J Vasc Interv Radiol* 1993;4:455-463.

CSA. 1984. CAN3-Z310.6-M84: Testing for Biocompatibility. A National Standard of Canada. Canadian Standard Association (CSA), Toronto, Canada.

Dai KR, Hou XK, Sun YH. Treatment of intra-articular fractures with shape memory compression staples. *Injury* 1993;24:651-655.

Dattilo JB, Brewster DC, Fan CM, Geller SC, Cambria RP, Lamuraglia GM, Greenfield AJ, Lauterbach SR, Abbott WM. Clinical failures of endovascular abdominal aortic aneurysm repair: incidence, causes, and management. *J Vasc Surg.* 2002 Jun;35(6):1137-1144.

Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, Baptiste D, Gillet P, Dellacherie E, Netter P, Payan E. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Jan;11(1):16-28.

De Rosnay, J. 2000. Les matériaux intelligents. Conférence UTLS du 04 Octobre 2000, Université de tous les savoirs (CNAM). In . *Le Carrefour du Futur; Regard vers le 3^{ème} millénaire*. [En ligne]. (http://csiweb2.cite-sciences.fr/derosnay/articles/imprimer/utls_conf.html). Page consultée le 28 mai 2003.

Desfaits AC, Raymond J. Growth factors stimulate neointimal cells *in vitro* and increase the thickness of the neointima formed at the neck of porcine aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 2000; 31: 498–507.

Doubleday B. Impression materials. *British Journal of Orthodontics*. 1998; 25: 133-140.

Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin I receptors. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):141-149.

Feuerberg I, Lindquist C, Lindquist M, Steiner L. Natural history of postoperative aneurysm rests. *J Neurosurg*. 1987; 66:30–34.

Fallier-Becker P, Betz E, Wolburg-Buchholz K, Fotev Z. Fibromuscular proliferates induced *in vitro* using a trans-filter culture system. *Res Exp Med (Berl)*. 1991;191(1):11-25.

Feldman LJ, Pastore CJ, Aubailly N, Kearney M, Chen D, Perricaudet M, Steg PG, Isner JM. Improved efficiency of arterial gene transfer by use of poloxamer 407 as a vehicle for adenoviral vectors. *Gene Ther.* 1997 Mar;4(3):189-98.

Forbes TL, DeRose G, Kribs S, Harris KA. A cost-effectiveness analysis of standard versus endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Can J Surg.* 2002 Dec;45(6):420-424.

Formichi M, Marois Y, Roby P, Marinov G, Stroman P, King MW, Douville Y, Guidoin R. Endovascular repair of thoracic aortic aneurysm in dogs: evaluation of a nitinol-polyester self-expanding stent-graft. *J Endovasc Ther.* 2000 Feb;7(1):47-67.

Frenger P. Biomedical uses of shape memory polymers. *Biomed Sci Instrum.* 1993;29:47-50.

Gailloud P, Pray JR, Muster M, Piotin M, Fasel JH, Rufenacht DA. An in vitro anatomic model of the human cerebral arteries with saccular arterial aneurysms. *Surg Radiol Anat.* 1997;19(2):119-121.

Galaev IY, Mattiasson B. 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends in Biotechnology.* 1999 Aug;17:335-340.

German WJ, Black SPW. Experimental production of carotid aneurysms. *New England J Med* 1954;250(3):104-106.

Gilling-Smith G, Brennan J, Harris P, Bakran A, Gould D, McWilliams R. Endotension after endovascular aneurysm repair: definition, classification, and strategies for surveillance and intervention. *J Endovasc Surg.* 1999 Nov;6(4):305-307. Review.

Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1996;8(1):63-75.

Gobin YP, Counord JL, Flaud P, Duffaux J. In vitro study of haemodynamics in a giant saccular aneurysm model: influence of flow dynamics in the parent vessel and effects of coil embolisation. *Neuroradiology.* 1994 Oct;36(7):530-536.

Graves VB, Partington CR, Rufenacht DA, Rappe AH, Strother CM. Treatment of carotid artery aneurysms with platinum coils: an experimental study in dogs. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1990 Mar-Apr;11(2):249-252.

Graves VB, Strother CM, Rappe AH. Treatment of experimental canine carotid aneurysms with platinum coils. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1993;14:787-793.

Gruber A, Bavinszki G, Killer M, al Shameri A, Richling B. *In vitro* training model for endovascular embolization of cerebral aneurysms. *Minim Invasive Neurosurg.* 1997 Dec;40(4):121-123.

GUIDANT. 2003. In *GUIDANT site*; Abdominal Aortic Aneurysm; What Is an Abdominal Aortic Aneurysm? [En ligne]. <http://www.guidant.com/webapp/emarketing/compass/comp.jsp?lev1=aaa&lev2=what> (Page consultée le 8 juillet 2003).

Guiry M. 2003. Alginates. In *Seaweed site*. [En ligne]. <http://seaweed.ucg.ie/SeaweedUsesGeneral/Alginates.html> (Page consultée le 26 mars 2003)

Hademenos GJ. The Biophysics of Stroke. *American Scientist* 1997 Ma-Jun;85:226-235.

Hademenos GJ, Massoud TF. Biophysical mechanisms of stroke. *Stroke*. 1997 Oct;28(10):2067-77. Review.

Hashimoto N, Handa H, Nagata I, Hazama F. Animal model of cerebral aneurysms: pathology and pathogenesis of induced cerebral aneurysms in rats. *Neurol Res*. 1984 Mar-Jun;6(1-2):33-40.

Hashimoto N, Kim C, Kikuchi H, Kojima M, Kang Y, Hazama F. Experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. *J Neurosurg* 1987 Dec;67(6):903-905.

Hasirci N. 1991. Interrelation of protein Adsorption and Blood Compatibility of Biomaterials. *High performance biomaterials: a comprehensive guide to medical and pharmaceutical applications*. Szycher M. Lancaster: Technomic Pub. Co. Chap. 5, pp71-90.

Hayashi S, Ishikawa N, Giordano C. High moisture permeability polyurethane for textile applications. *Proceeding of SPI/SOPA Polyurethane World Congress (Div. 35th Annual Cong.)*, Vancouver, BC, Canada. 1993:400-404.

Hayashi S, Shirai Y. Shape Memory Polymer: Properties. *Mitsubishi Techn Bull* December 1988;no.184.

Huang K, Lee BP, Ingram DR, Messersmith PB. Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups. *Biomacromolecules*. 2002;3:397-406.

Jobin F. 1995. L'hémostase. Les Presses de l'Université Laval. Éditions Maloine. 496p.

Johansen. 1983. In *Les Nouveaux moyens de la médecine*. Pour la science, Paris. 1983. 239p.

Johnson GM, Upman PJ, Wallin RF. A Practical Guide to ISO 10993-3: Genotoxicity. MDDI 1998: p.93.

Johnston SC, Higashida RT, Barrow DL, Caplan LR, Dion JE, Hademenos G, Hopkins LN, Molyneux A, Rosenwasser RH, Vinuela F, Wilson CB. Recommendations for the endovascular treatment of intracranial aneurysms: a statement for healthcare professionals from the Committee on Cerebrovascular Imaging of the American Heart Association Council on Cardiovascular Radiology. *Stroke* 2002; 33(10): 2536-2544.

Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release*. 2002 Aug 21;82(2-3):189-212. Review.

Kalliafas S, Albertini JN, Macierewicz J, Yusuf SW, Whitaker SC, Davidson I, Hopkinson BR. Stent-graft migration after endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *J Endovasc Ther*. 2002 Nov-Dec;9(6):743-747.

Kallmes DF, Fujiwara NH, Berr SS, Helm GA, Cloft HJ. Elastase-induced saccular aneurysms in rabbits: A dose-escalation study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002 Feb;23:295-298.

Kallmes DF, Helm GA, Hudson SB, Altes TA, Do HM, Mandell JW, Cloft HJ. Histologic evaluation of platinum coil embolization in an aneurysm model in rabbits. *Radiology*. 1999 Oct;213(1):217-222.

Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg.* 1990 Jul;73(1):18-36.

Kim C, Kikuchi H, Hashimoto N, Hazama F. Histopathological study of induced cerebral aneurysms in primates. *Surg Neurol* 1989 Jul;32(1):45-50.

Koivisto T, Vanninen R, Hurskainen H, Saari T, Hernesniemi J, Vapalahti M. Outcomes of early endovascular versus surgical treatment of ruptured cerebral aneurysms. A prospective randomized study. *Stroke* 2000;31(10):2369-2377.

Konya A, Maxin M, Wright KC. New embolization coil containing a Nitinol wire core: preliminary in vitro and in vivo experiences. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12(7):869-877.

Kopitnik TA, Samson DS. Management of subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993 Sep;56(9):947-959. Review.

Krakovský I, Ilavský M, Pospíšil H, Pleštil J. 2003. Posters; P01: Structure of pluronic-based networks. In *Institute of macromolecular chemistry*. [En ligne]. <http://www.imc.cas.cz/sympo/20discon/posters.htm> (Page consultée le 27 mars 2003)

Kumar A, Lindner V. Remodelling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):2238-2244.

Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001;22(6):511-521.

Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, Gold JP, Simons M. Local Perivascular Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery : Results of a Phase I Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Circulation* 1999;100(18):1865-1871.

Laroche G. 1997. Session: C-505 matériaux en implantologie : développement et amélioration étape par étape. In *65^e Congrès de l'Acfas*. [En ligne]. <http://www.acfas.ca/congres/congres65/Coll505.htm> (Page consultée le 22 avril 2003)

Lendlein A, Langer R. Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science* 2002;296(5573): 1673-1676.

Lendlein A, Schmidt AM, Langer R. AB-polymer networks based on oligo(ϵ -caprolactone) segments showing shape-memory properties. *PNAS* 2001;98:842-847.

Lin T, Fox AJ, Drake CG. Regrowth of aneurysm sacs from residual neck following aneurysm clipping. *J Neurosurg* 1989; 70 :556 –560.

Lipscomb IP, Nokes LDM. *The Application of Shape Memory Alloys in Medicine*. Norfolk: Paston Press Ltd (1996).

Lugmayr HF, Holzer H, Kastner M, Riedelsberger H, Auterith A. Treatment of complex arteriosclerotic lesions with Nitinol stents in the superficial femoral and popliteal arteries: A midterm follow-up. *Vascular and Interventional Radiology* 2002; 222: 37-43.

MacDonald D.J., Finlay H.M., Canham, P.B. Directional Wall Strength in Saccular Brain Aneurysms from Polarized Light Microscopy. *Annals of Biomedical Engineering* 2000;28:533-542.

Macdonald RL, Mojtahedi S, Johns L, Kowalczyk A. Randomized comparison of Guglielmi detachable coils and cellulose acetate polymer for treatment of aneurysms in dogs. *Stroke*. 1998 Feb;29(2):478-485.

Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jonsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-grafts in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Jan;19(1):5-11.

Mawad ME, Mawad JK, Cartwright J, Gokasian Z. Long-term histopathologic changes in canine aneurysms embolized with Guglielmi detachable coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995;16:7-13.

Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, Sternau LL, Torner J, Adams HP Jr, Feinberg W, *et al*. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2592-605.

Maynard C, Swenson R, Paris JA, Martin JS, Hallstrom AP, Cerqueira MD, Weaver WD. Randomized, controlled trial of RheothRx (poloxamer 188) in patients with suspected acute myocardial infarction. RheothRx in Myocardial Infarction Study Group. *Am Heart J*. 1998 May;135(5 Pt 1):797-804.

Mayo Clinic. 1999. In *Aortic Aneurysm; Overview*. [En ligne]. <http://www.mayoclinic.com/invoke.cfm?objectid=FE3FE459-7D1E-405F-95E9339CD2E974B8> (Page consultée le 8 juillet 2003).

McArthur C, Teodorescu V, Eisen L, Morrissey N, Faries P, Hollier L, Marin ML. Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: Does healing occur? *J Vasc Surg*. 2001 Apr;33(4):733-738.

MCG. 1999. Report on Biomaterial-Tissue Interactions. Medical College of Georgia (MCG). Wataha, Sept. 1999. [En ligne]. <http://www.mcg.edu/research/bmrcplan/Appendix3/BiomatTissInter.pdf> (Page consultée le 11 juin 2003).

McMahon N. 2003. Aneurysms. In. *Mayfield Clinic; Diseases and Disorders*. [En ligne]. <http://www.mayfieldclinic.com/PE/PE-ANEU.htm> (Page consultée le 19 juin 2003).

Metcalfe A, Desfaits AC, Salazkin I, Yahia L'H, Sokolowski W, Raymond J. Cold Hibernated Elastic Memory foams for endovascular interventions. *Biomaterials*. 2003 Feb;24(3):491-497. Erratum in: *Biomaterials*. 2003 Apr;24(9):1681.

Mialhe C, Amicabile C, Becquemin JP. Endovascular treatment of infrarenal abdominal aneurysms by the Stentor system: preliminary results of 79 cases. *J Vasc Surg* 1997; 26:199-209.

Mierisch CM, Cohen SB, Jordan LC, Robertson PG, Balian G, Diduch DR, Robertson PG. Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy*. 2002 Oct;18(8):892-900.

Moghimi SM, Hunter AC. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol*. 2000 Oct;18(10):412-420. Review.

Molyneux A, Kerr R, Stratton I, Sandercock P, Clarke M, Shrimpton J, Holman R. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus

endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1267-1274.

Monkman GJ. Advances in shape memory polymer actuation. *Mechatronics* 2000;10 :489-498.

Morimoto MS, Miyamoto S, Mizoguchi A, Kume N, Kita T, Hashimoto N. Mouse model of cerebral aneurysm: experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes. *Stroke* 2002 ;33(7): 1911-1915.

Mottu F, Gailloud P, Massuelle D, Rufenacht DA, Doelker E. In vitro assessment of new embolic liquids prepared from preformed polymers and water-miscible solvents for aneurysm treatment. *Biomaterials* 2000;21(8):803-811.

Mullen Y, Maruyama M, Smith CV. Current progress and perspectives in immunoisolated islet transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000;7(4):347-57. Review.

Murayama Y, Nien YL, Duckwiler G, Gobin YP, Jahan R, Frazee J, Martin N, Vinuela F. Guglielmi detachable coil embolization of cerebral aneurysms: 11 years' experience. *J Neurosurg*. 2003 May;98(5):959-66.

Murayama Y, Vinuela F, Duckwiler G, Gobin YP, Guglielmi G. Embolization of incidental aneurysms by using the Guglielmi detachable coil system. *J Neurosurg*. 1999;90:207-214.

Murayama Y, Vinuela F, Suzuki Y, Do HM, Massoud TF, Guglielmi G, Ji C, Iwaki M, Kusakabe M, Kamio M, Abe T. Ion implantation and protein coating of detachable coils

for endovascular treatment of cerebral aneurysms: concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurgery*. 1997;40:1233–1244.

Murayama Y, Vinuela F, Tateshima S, Song JK, Gonzalez NR, Wallace MP. Bioabsorbable polymeric material coils for embolization of intracranial aneurysms: a preliminary experimental study. *J Neurosurg* 2001;94(3):454-463.

Murayama Y, Vinuela F, Ulhoa A, Akiba Y, Duckwiler GR, Gobin YP, Vinters HV, Greff RJ. Nonadhesive liquid embolic agent for cerebral arteriovenous malformations: preliminary histopathological studies in swine rete mirabile. *Neurosurgery*. 1998 Nov;43(5):1164-1175.

Nagata I, Handa H, Hashimoto N, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part VI. Hypertension. *Surg Neurol*. 1980 Dec;14(6):477-479.

Nakayama Y, Matsuda T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: preparation of microporous polymer surfaces by an excimer laser ablation technique. *J Biomed Mater Res*. 1995 Oct;29(10):1295-301.

Nakayama Y, Nishi S, Ishibashi-Ueda H, Matsuda T. Surface microarchitectural design in biomedical applications: in vivo analysis of tissue ingrowth in excimer laser-directed micropored scaffold for cardiovascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):520-528.

Nemets EA, Sevastianov VI. The interaction of heparinized biomaterials with human serum, albumin, fibrinogen, antithrombin III, and platelets. *Artif Organs*. 1991 Oct;15(5):381-385.

Ng P, Khangure MS, Phatouros CC, Bynevelt M, ApSimon H, McAuliffe W. Endovascular treatment of intracranial aneurysms with Guglielmi detachable coils: Analysis of midterm angiographic and clinical outcomes. *Stroke* 2002; 33: 210-217.

Nonionic Surfactants: polyoxyalkylene block copolymers, Vol. 60. Nace VM, Dekker M (editors), New York, 1996. 280 pp.

Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M. Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr Gene Ther.* 2001 May;1(1):31-52. Review.

Odegard A, Lundbom J, Myhre HO, Hatlinghus S, Bergh K, Waage A, Bjerve KS, Mollnes TE, Aadahl P, Lie TA, Videm V. The inflammatory response following treatment of abdominal aortic aneurysms: a comparison between open surgery and endovascular repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000 May;19(5):536-544.

O'Keefe JH, Grines CL, DeWood MA, Schaer GL, Browne K, Magorien RD, Kalbfleisch JM, Fletcher WO Jr, Bateman TM, Gibbons RJ. Poloxamer-188 as an adjunct to primary percutaneous transluminal coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1996 Oct 1;78(7):747-750.

OLF. 2003. *Grand Dictionnaire Terminologique*. Office Québécois de la Langue Française (OLF) [En ligne]. http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp (Page consultée le 1^{er} juillet 2003).

Oowaki H, Matsuda S, Sakai N, Ohta T, Iwata H, Sadato A, Taki W, Hashimoto N, Ikada Y. Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery. *Biomaterials* 2000;21(10):1039-1046.

Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends Biotechnol.* 2002 Sep;20(9):382-7. Review.

Orringer EP, Casella JF, Ataga KI, Koshy M, Adams-Graves P, Luchtman-Jones L, Wun T, Watanabe M, Shafer F, Kutlar A, Abboud M, Steinberg M, Adler B, Swerdlow P, Terregino C, Saccente S, Files B, Ballas S, Brown R, Wojtowicz-Praga S, Grindel JM. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 Nov 7;286(17):2099-2106.

Osborn AG. Intracranial aneurysms. In: Brant-Zawadski M, Drayers BP, eds. Core curriculum course in neuroradiology. Part I: Vascular lesions and degenerative diseases. American Society of Neuroradiology, Chicago, IL, April 21-22, 1995.

Palmaz JC, Richter GM, Noldge G, Kaufmann GW, Wenz W. Intraluminal Palmaz stent implantation. The first clinical case report on a balloon-expanded vascular prosthesis. *Radiol* 1987;27:560-563.

Parodi JC, Ferreira LM, Beebe HG. Endovascular treatment of aneurysmal disease. *Cardiol Clin.* 2002 Nov;20(4):579-588, vii. Review.

Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991 ; 5(6): 491-499.

Pasic M, Müller-Glauser W, Odermatt B, Lachat M, Seifert B, Turina M. Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small diameter Dacron grafts. *Circulation* 1995;92:2605-2616.

Patterson MA, Jean-Claude JM, Crain MR, Seabrook GR, Cambria RA, Rilling WS, Towne JB. Lessons learned in adopting endovascular techniques for treating abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg* 2001;136:627-634.

Peters DG, Kassam AB, Feingold E, Heidrich-O'Hare E, Yonas H, Ferrell RE, Brufsky A. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: Coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodelling. *Stroke*. 2001;32:1036-1042.

Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Dec 31;53(3):321-339. Review.

Rajinikanth PS, Sankar C, Mishra B. Sodium alginate microspheres of metoprolol tartrate for intranasal systemic delivery: development and evaluation. *Drug Deliv*. 2003 Jan-Mar;10(1):21-28.

Ratner BD. 1996. *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. San Diego ; Toronto : Academic Press, c1996. 484 p.

Raymond J, Berthelet F, Desfaits AC, Salazkin I, Roy D. Cyanoacrylate embolization of experimental aneurysms. *Am J Neuroradiol*. 2002 jan;23:129-138.

Roy D, Raymond J, Bouthillier A, Bojanowski MW, Moundjian R, L'Esperance G. Endovascular treatment of ophthalmic segment aneurysms with Guglielmi detachable coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1997 Aug;18(7):1207-1215.

Raymond J, Desfaits AC, Roy D. Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 1999;30:1657-1664.

Raymond J, Guilbert F, Weill A, Georganos SA, Juravsky L, Lambert A, Lamoureux J, Chagnon M, Roy D. Long-term angiographic recurrences after selective endovascular

treatment of aneurysms with detachable coils. *Stroke*. 2003 Jun;34(6):1398-403. Epub 2003 May 29.

Raymond J, Leblanc P, Desfaits AC, Salazkin I, Morel F, Janicki C, Roorda S. *In situ* beta radiation to prevent recanalization after coil embolization of cerebral aneurysms. *Stroke* 2002 Feb;33(2):421-427.

Raymond J, Leblanc P, Morel F, Salazkin I, Gevry G, Roorda S. Beta radiation and inhibition of recanalization after coil embolization of canine arteries and experimental aneurysms: how should radiation be delivered? *Stroke*. 2003 May;34(5):1262-8. Epub 2003 Apr 17.

Raymond J, Metcalfe A, Desfaits AC, Ribourtout E, Salazkin I, Gilmartin K, Embry G, Boock RJ. Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003 Jun-Jul;24(6):1214-1221.

Raymond J, Metcalfe A, Salazkin I, Schwarz A. Temporary vascular occlusion with poloxamer 407. In press, *Biomaterials*.

Raymond J, Roy D. Safety and efficacy of endovascular treatment of acutely ruptured aneurysms. *Neurosurg* 1997 Dec;41(6):1235-1246.

Raymond J, Roy D, Bojanowski M, Moundjian R, L'Espérance G. Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurgery* 1997; 86 :211–219.

Raymond J, Salazkin I, Metcalfe A, Guilbert F, Weill A, Roy D. High concentration ethylene-vinyl alcohol copolymer and endovascular treatment of experimental

aneurysms: feasibility of embolisation without protection devices at the neck. Accepted pour publication: *American Journal of Neuroradiology (AJNR)*.

Raymond J, Sauvageau E, Salazkin I, Ribourtout E, Gevry G, Desfaits AC. Role of the endothelial lining in persistence of residual lesions and growth of recurrences after endovascular treatment of experimental aneurysms. *Stroke*. 2002 Mar;33(3):850-855.

Raymond J, Venne D, Allas S, Roy D, Oliva VL, Denbow N, Salazkin I, Leclerc G. Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol*. 1999 Mar;26(1):7-20.

Read TA, Farhadi M, Bjerkvig R, Olsen BR, Rokstad AM, Huszthy PC, Vajkoczy P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer Res*. 2001; 61(18):6830-6837.

Resch T, Ivancev K, Brunkwall J, Nyman U, Malina M, Lindblad B. Distal migration of stent-grafts after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol*. 1999 Mar;10(3):257-264; discussion 265-266.

Reul J, Weis J, Spetzger U, Konert T, Fricke C, Thron A. Long-term angiographic and histopathologic findings in experimental aneurysms of the carotid bifurcation embolized with platinum and tungsten coils. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1997;18:35-42.

Ribourtout E, Desfaits AC, Salazkin I, Raymond J. *Ex vivo* gene therapy with adenovirus-mediated transforming growth factor β -1 expression for endovascular treatment of aneurysms: results in a canine bilateral aneurysm model. To be published in *Journal of Vascular Surgery*.

Robin J, Martinot S, Curtil A, Vedrinne C, Tronc F, Franck M, Champsaur G. Experimental right ventricle to pulmonary artery discontinuity: outcome of polyurethane valved conduits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115(4):898-903.

Roche JL, Choux M, Czorny A, Dhellemmes P, Fast M, Frerebeau P, Lapras C, Sautreaux JL. [Intracranial arterial aneurysm in children. A cooperative study. Apropos of 43 cases] *Neurochirurgie*. 1988;34(4):243-51. French.

Roeck-Holtzhauer YG. Uses of Seaweeds in Cosmetics. In: *Seaweed Resources in Europe, Uses and Potential* (Guiry M. D., Blunden G., eds.). John Wiley & Sons, Sussex ; 1991 :83-93.

Ron ES, Bromberg LE. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998 May 4;31(3):197-221.

Roy D, Milot G, Raymond J. Endovascular treatment of unruptured aneurysms. *Stroke*. 2001; 32: 1998–2004.

Saad B, Neuenschwander P, Uhlschmid GK, Suter UW. New versatile, elastomeric, degradable polymeric materials for medicine. *Int J Biol Macromol* 1999; 25: 293-301.

Salamat M, Brown PR, Magee CA, Reyes DK, Peters DN, Venbrux AC. Experimental evaluation of a new transcatheter vascular embolization device in the swine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(3): 301-312.

Salgado AJ, Gomes ME, Chou A, Coutinho OP, Reis RL, Hutmacher DW. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. *Materials Science and Engineering C*. 2002;20:27-33.

Schievink WI. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 1997 Apr;40(4):651-662; discussion 662-663.

Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. *Br J Surg*. 1999 May;86(5):581-587.

Schwartz RS, Holmes DR Jr, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 1992;20(5):1284-1293.

Sedel L et Janot C. Biomatériaux. Rapport du Centre national de la Recherche Scientifique. [En ligne]. http://www.cnrs.fr/Chimie/PAGES/programmes_scientifiques/Biomateriaux.pdf (Page consultée le 11 juin 2003).

Shape Change Technologies. 2003. NiTi Shape Memory Alloys. [En ligne]. <http://www.shape-change.com/docs/aboutSMA.htm> (Page consultée le 08 avril 2003).

Simon M, Kaplow R, Salzman E, Freiman D. A vena cava filter using thermal shape memory alloy. *Experimental aspects. Radiology*. 1977 Oct;125(1):87-94.

Sokolowski W. CHEM expandable structures. *Proceeding of 2nd National Space Inflatable Workshop, Pasadena, CA, May 20-21, 1998*. p.105-108.

Sokolowski W, Chmielewski A. Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) expandable structures. *NASA Tech Briefs, February 1999*:p.56-57.

Sokolowski W, Chmielewski A, Awaya H. Solar heating for deployment for CHEM foam structures. *NASA Tech Briefs, October 2001*:p.36-37.

Sokolowski W, Chmielewski A, Hayashi S, Yamada T. Cold Hibernated Elastic Memory (CHEM) self-deployable structures. Proceeding of SPIE International Symposium on Smart Structures and Materials, Vol.3669, 1-5 March 1999, Newport Beach, CA. p.179-185.

Soulez G, Oliva VL, Bui BT, Choinière M, Thérasse É, Perreault P, Dufresne MP, Blair JF, Ghali R, Rabbat A, Ghosn P, Lelorier J. Prospective randomized study for the evaluation of stents-grafts versus conventional surgery for the treatment of non-ruptured aneurysms of the infrarenal abdominal aorta. Département de radiologie, chirurgie et médecine, Centre hospitalier de l'Université de Montréal. 2003. Non publié.

Szycher, M. Biocompatible polymers, metals, and composites. Technomic, Lancaster, Penns. 1983. 1071p.

Tamatani S, Ozawa T, Minakawa T, Takeuchi S, Koike T, Tanaka R. Radiologic and histopathologic evaluation of canine artery occlusion after collagen-coated platinum microcoil delivery. *Am J Neuroradiol.* 1999 Apr;20(4):541-545.

Tenjin H, Fushiki S, Nakahara Y, Masaki H, Matsuo T, Johnson CM, Ueda S. Effect of Guglielmi detachable coils on experimental carotid artery aneurysms in primates. *Stroke.* 1995;26:2075–2080.

Thompson SA. An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry. *Int Endod J.* 2000 Jul;33(4):297-310. Review.

Tobushi H, Hayashi S, Kojima S. Mechanical properties of shape memory polymer of polyurethane series. *JSME Int Journal* 1993;1(35):296-302.

Tremblay MC. 2003. Anévrisme cérébral. In. *Service Vie Santé*. [En ligne]. http://www.servicevie.com/02Sante/Cle_des_maux/A/maux106.html (Page consultée le 22 avril 2003)

Van Belle E, Maillard L, Rivard A, Fabre JE, Couffinhal T, Kearney M, Branellec D, Feldman LJ, Walsh K, Isner JM. Effects of poloxamer 407 on transfection time and percutaneous adenovirus-mediated gene transfer in native and stented vessels. *Hum Gene Ther*. 1998 May 1;9(7):1013-24.

Veith FJ, Baum RA, Ohki T, Amor M, Adiseshiah M, Blankensteijn JD, Buth J, Chuter TA, Fairman RM, Gilling-Smith G, Harris PL, Hodgson KJ, Hopkinson BR, Ivancev K, Katzen BT, Lawrence-Brown M, Meier GH, Malina M, Makaroun MS, Parodi JC, Richter GM, Rubin GD, Stelter WJ, White GH, White RA, Wisselink W, Zarins CK. Nature and significance of endoleaks and endotension: summary of opinions expressed at an international conference. *J Vasc Surg*. 2002 May;35(5):1029-1035. Review.

Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, Brazeau P. Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol*. 1999 Jun;26(2):92-100.

Verdant, A. Les anévrismes de l'aorte thoracique et abdominale: point de vue d'un chirurgien clinicien. *Le Clinicien*. 2002 Jan ;17(1) :93-104.

Vignali C, Cioni R, Neri E, Petrucci P, Bargellini I, Sardella S, Ferrari M, Caramella D, Bartolozzi C. Endoluminal treatment of abdominal aortic aneurysms. *Abdom Imaging* 2001;26(5):461-468.

von Recum, AF. 1999. Handbook of Biomaterials Evaluation; Scientific, Technical, and Clinical testing of Implant Materials. Second Edition. Taylor & Francis. Philadelphia, PA, USA. 915 p.

Wabers HD, Hergenrother RW, Coury AJ, Cooper SL. Thrombus deposition on polyurethanes designed for biomedical applications. *J Appl Biomater* 1992;3(3):167-176.

Wallin RF, Arscott EF. A Practical Guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *MDDI*, Apr 1998;96-98.

Watt A., Pellegrino S, Sokolowski W. Thermo-mechanical properties of a shape memory polymer foams. To be published in Institute of Physics, *Journal of Smart Materials and Structures*.

Wheatley DJ, Raco L, Bernacca GM, Sim I, Belcher PR, Boyd JS. Polyurethane: material for the next generation of heart valve prostheses? *Eur J Cardiothorac Surg* 2000 ;17(4) :440-448.

White RA, Donayre C, Walot I, Stewart M. Abdominal aortic aneurysm rupture following endoluminal graft deployment: report of a predictable event. *J Endovasc Ther* 2000;7(4):257-262.

White GH, May J, Waugh RC, Chafour X, Yu W. Type III and type IV endoleak: toward a complete definition of blood flow in the sac after endoluminal AAA repair. *J Endovasc Surg.* 1998 Nov;5(4):305-309.

White GH, May J, Petrsek P, Waugh R, Stephen M, Harris J. Endotension: an explanation for continued AAA growth after successful endoluminal repair. *J Endovasc Surg.* 1999 Nov;6(4):308-315.

White GH, Yu W, May J, Chaufour X, Stephen MS. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of aortic aneurysms: Classification, incidence, diagnosis, and management. *J Endovasc Surg* 1997;4:152-168.

Williams DF, Black J et Doherty PJ. 1992. Consensus report of second conference on definitions in biomaterials. In: Doherty PJ, Williams RL, Williams DF & Lee AJC (eds) *Biomaterial-tissue interfaces*, Volume 10. Elsevier, Amsterdam, p 525-533.

Windecker S, Roffi M, Meier B. Sirolimus eluting stent: a new era in interventional cardiology? *Curr Pharm Des.* 2003;9(12):1077-1094.

Wise DL. 2000. *Biomaterials an Bioengineering Handbook*. Marcel Dekker, Inc.. New York, NY, USA. 920 p.

Wright KA, Nadire KB, Busto P, Tubo R, McPherson JM, Wentworth BM. Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns.* 1998 Feb;24(1):7-17.

Yamashita Y, Shimada M, Tsujita E, Tanaka S, Ijima H, Nakazawa K, Sakiyama R, Fukuda J, Ueda T, Funatsu K, Sugimachi K. Polyurethane foam/spheroid culture system using human hepatoblastoma cell line (Hep G2) as a possible new hybrid artificial liver. *Cell Transplant.* 2001;10(8):717-22.

Yasargil MG. Pathological considerations. In: *Microsurgery*. Stuttgart: Thieme Verlag; 1984. p.280-281.

Zdrahala RJ, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 1999;14(1):67-90.

Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng.* 2001 Oct;7(5):557-572.

Zhang L, Parsons DL, Navarre C, Kompella UB. Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J Control Release.* 2002 Dec 13;85(1-3):73-81.

ANNEXES

ANNEXE 1. 2° ARTICLE : Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery. AJNR Am J Neuroradiol. 2003 Jun-Jul;24(6):1214-1221.

Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery

Jean Raymond¹, Annick Metcalfe¹, Anne-Cecile Desfaits¹, Edith Ribourtout¹, Igor Salazkin¹, Kevin Gilmartin², Gill Embry² and Robert J. Boock².

¹ Interventional Neuroradiology Laboratory, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Montreal, Quebec, Canada and ²Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA

Address for correspondance and reprint requests:

Jean Raymond, MD

¹Interventional Neuroradiology Laboratory

CHUM Research Center - Notre-Dame Hospital

1560 Sherbrooke east, suite M-8203

Montreal, Quebec, Canada

H2L 4M1

Fax: (514) 412-7603

Tel.: (514) 890-8000 ext. 27235

e-mail:

dr_jean_raymond@hotmail.com

Abstract

Background and purpose: To explore the use of alginate as a new embolic agent that could deliver growth factors and improve results of endovascular treatment of aneurysms.

Methods: We first assessed the potential of alginate as a vector for growth factor (GF) delivery using *in vitro* binding and elution studies. Lateral wall (n = 68) and bifurcation (n = 4) aneurysms were then constructed in 6 pigs and 36 dogs. We explored ^{125}I -TGF- β_1 *in vivo* alginate delivery in 16 canine aneurysms. We next assessed the effects of adding alginate to gelatin sponges on angiographic and pathological results at 3 weeks (n = 4 each) in an established model used for the study of recanalization and recurrence. We then explored techniques to control endovascular alginate delivery, without (n = 4) or with the protection of a balloon (n = 4) or a single coil (n = 12) at the neck of 12 porcine, 4 canine lateral wall and 4 canine bifurcation aneurysms. The stability of cross-linked alginate was studied following peroperative injections in 8 aneurysms. Finally, to determine the value of the material with or without GF in promoting aneurysm healing, we compared angiographic results and neointima formation 3 weeks after intra-operative embolization of canine lateral wall aneurysms with alginate blocks with or without PDGF-BB or TGF- β_1 (n=5 for each).

Results: Growth factors rapidly eluted from alginate *in vitro* and *in vivo*. Alginate coating of sponges led to improved angiographic results and thick neointima formation. Peroperative alginate block embolization did not lead to recurrence, and GFs delivered with alginate did not show added benefits. Endovascular alginate embolization was complicated by carotid emboli, and the polymer was unstable once injected, causing delayed neurological deficits.

Conclusion: Growth factor delivery can be performed with alginate, but formulation changes and improved endovascular control are necessary before contemplating its use in intracranial aneurysms.

1. Introduction

Endovascular treatment of intracranial aneurysms is most often performed with platinum coils. This alternative to surgery has proven safe and effective during the acute phase following aneurysmal rupture [1]. An important drawback of this approach is a higher incidence of recurrence as compared to surgical clipping [2-5]. The search for bioactive embolic agents aims at improving long-term results by inhibiting recanalization [6] or by stimulating neointima formation at the neck of treated aneurysms [7].

Alginate is a compound that has been extensively used in cosmetic, dental, and pharmaceutical applications [8-10]. More recently it has also been proposed as an embolic agent for arteriovenous malformations, at least in experimental models [11], as well as for transcatheter cell grafting strategies and growth factor delivery [12, 13].

We have explored the potential use of alginate as an embolic agent that could deliver, locally, growth factors known to be involved in neointima formation, and hopefully promote aneurysmal healing after embolization [7].

2. Materials and methods

A) Experimental design

Our first goal was to study the potential of alginate as a vector for the delivery of growth factors. We first assessed growth factor binding efficiency during alginate polymerization, and *in vitro* growth factor elution from alginate blocks after 1 hour to 7 days of incubation in phosphate buffered saline (PBS). The various *in vivo* experiments that were performed are illustrated in Fig 1. We studied kinetics of $^{125}\text{TGF-}\beta_1$ elution from alginate blocks implanted in lateral wall canine aneurysms (Group 1; n=16 aneurysms). Before designing a trans-catheter delivering system, we next wanted to assess the effects of the addition of an alginate coating to gelatin sponges used for embolization on angiographic and pathological results in a canine lateral wall aneurysm model known for its propensity for recurrences at 3 weeks (Group II; n=8 aneurysms) [14]. We then explored two means of controlling trans-catheter deliver of alginate through double lumen microcatheters, first in a porcine lateral wall (Group III; n=12), then in canine lateral wall (Group IV A; n=4) or bifurcation (Group IV B; n=4) aneurysm models (total 20 aneurysms): alginate delivery under the protection of a balloon occluding the neck (n=4) and injection after deposition of a single GDC coil (n=12), other aneurysms being injected without protection (n=4).

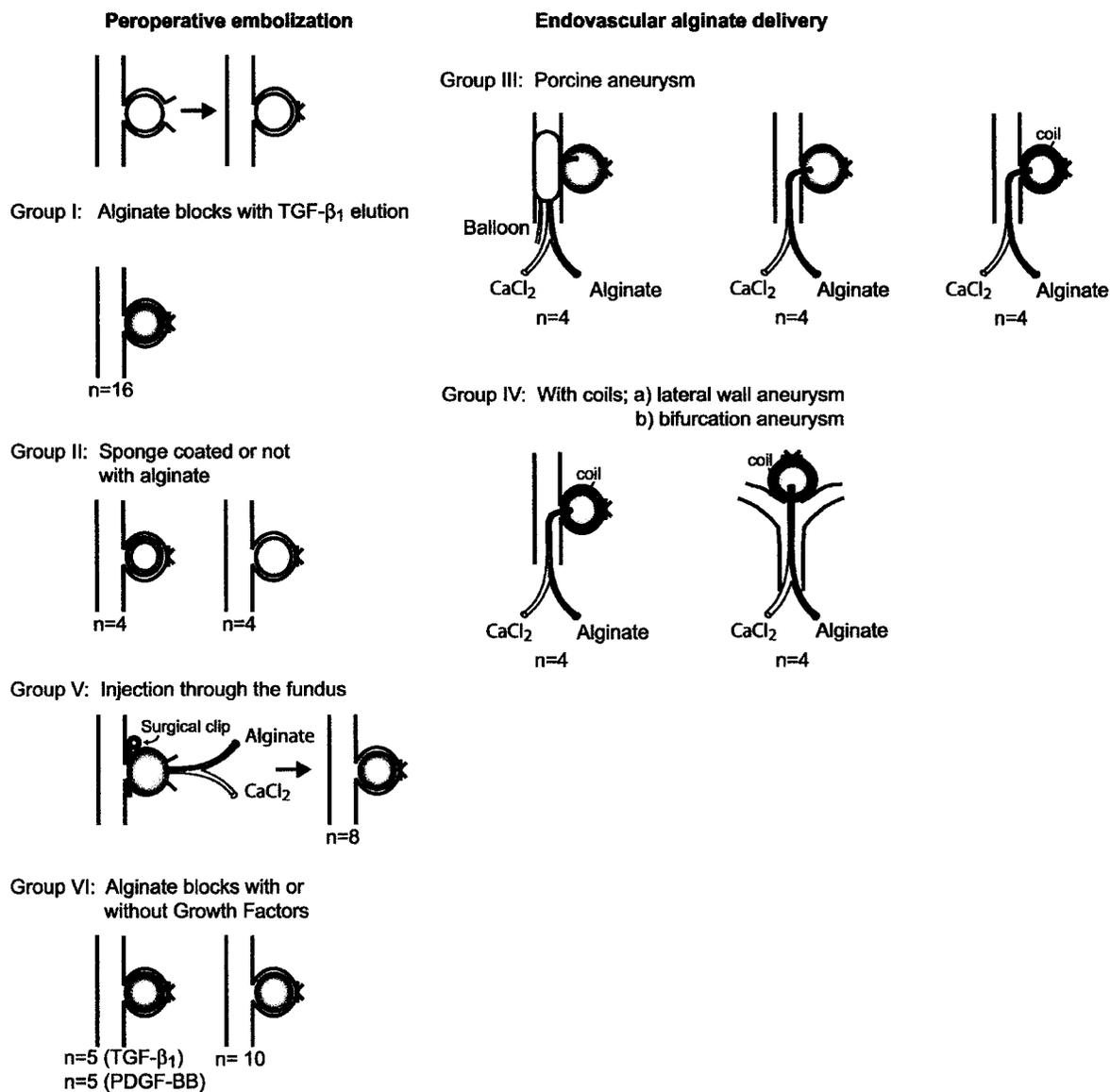


Figure 1. Experimental models. Groups of animals and experimental models are illustrated (see text for details).

To assess the stability of cross-linked alginate under high flow conditions, the polymer was peroperatively injected through the fundus, under the protection of a surgical clip temporarily occluding the neck (Group V; n=8). Finally, to determine the value of local

growth factor delivery in aneurysmal healing following alginate embolization, we compared angiographic results and neointima formation 3 weeks after intra-operative embolization of canine lateral wall aneurysms with alginate blocks (Group VI), with or without PDGF-BB or TGF- β_1 (n=5 animals each).

B) Methods

1) Alginate preparation

2.0% by weight alginate solutions were prepared by dissolving alginate powder (Boston Scientific Corp) in 0.5% sodium chloride. Calcium chloride (CaCl_2) was used as the cross-linking agent.

a) Cross-linking of alginate

To determine the reproducibility of CaCl_2 polymerization, amino black crystals were added to the alginate solution. Polymerization after adding 200 μl of 5 % CaCl_2 to 200 μl of 2 % alginate solution was assessed by weighting alginate pellets and by measuring the optical density of the CaCl_2 excess. This test was repeated 10 times in 2 different experiments.

b) *In vitro* elution assays

Growth factors (GFs) were added to 200 μl of the alginate solution (150 ng I^{125} -PDGF-BB or I^{125} -TGF- β_1 (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) before cross-linking with 200 μl of CaCl_2 5% in wells of 96 well culture dishes. At least 10 pellets were prepared and incubated at 37°C for 1, 2, 4, 6 hours, 1, 2, 3 and 7 days in incubation medium. Excess CaCl_2 solution from each well was kept frozen for final counting. The alginate pellets were dissolved by the addition of 1 ml of 2% EDTA followed by

centrifugation at 37°C for 2 hours. For each time point, excess CaCl₂ solution after polymerization, and dissolved alginate pellets, were counted by scintillation counting. Results are expressed as % of total activity remaining in the alginate pellet. Experiments were performed in triplicates.

c) Alginate blocks for intra-operative embolisation

The blocks used for *in vivo* aneurysm embolization were prepared in a similar fashion to the *in vitro* pellets, but using CaCl₂ 10% and 1.5 ml eppendorf tube as molds. Growth factors added to the alginate solution were 1µg PDGF-ββ and 1.5 µg TGF-β₁. For *in vivo* elution assays, 150 ng of I¹²⁵-TGF-β₁ were added to the growth factor/alginate solution.

2) Surgical construction of aneurysms and intraoperative embolisation

Protocols for animal experimentation were approved by the institutional Animal Committee in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Beagles (n=40) weighting 10 to 15 kg were sedated with an intramuscular injection of acepromazine (0.1 mg/kg), glycopyrrolate (0.01 mg/kg), and butorphanol (0.1 mg/kg), and anesthetized with intravenous thiopental (15 mg/kg). Six pigs weighting 20 kg were also used to study endovascular alginate delivery. Animals were ventilated artificially and maintained under surgical anesthesia with 2% isoflurane. Postoperative analgesia was provided for 3 days by a 50 µg Fentanyl skin patch. Lateral wall aneurysms were constructed on each common carotid artery by a technique previously described [7, 14-15]. Two segments of the same external jugular vein were harvested for construction of the venous pouches. After temporary occlusion of the common carotid artery, an oval 5 mm arteriectomy was performed and the venous pouch was sutured to the arterial wall with 7-0 prolene. Gelfoam sponges (UpJohn, Don Mills, Ontario, CANADA), coated or not with alginate, or alginate blocks (polymerized *in vitro*), with or without GFs, were

inserted from the fundus into the aneurysm to completely occlude it. To study *in situ* stability of cross-linked alginate delivered by the double-lumen microcatheter, the material was injected peroperatively through the fundus, before closure, under the protection of a surgical clip temporarily occluding the neck. In 4 animals, the CaCl_2 solution was labeled with 300 μCi of strontium 85 (^{85}Sr) for scintigraphic studies performed at 3 hours, 1 week and 3 weeks. The fundus of lateral wall aneurysms measured approximately 8 mm, with a 5 mm neck. Terminal bifurcation aneurysms were constructed in a similar fashion after a T-type bifurcation was created between the 2 common carotid arteries according to the technique of Graves *et al.* [16]. Bifurcation aneurysms had a 10 mm fundus and a 5 mm neck. Transfemoral angiography was undertaken immediately after surgery in all animals. During recovery, the dogs were fed with a normal diet, and their activities were not restricted.

3) Endovascular treatment of lateral wall and bifurcation aneurysms with alginate alone or under the protection of balloons or coils

Endovascular alginate embolization was performed immediately after aneurysm construction in porcine aneurysms, and at least 2 weeks after aneurysm construction in canine aneurysms. A double lumen microcatheter (Boston Scientific, Natick, MA, USA) was specifically designed for the endovascular delivery of alginate and CaCl_2 . The two lumens joined into a common channel at the distal end to allow polymerization into a string of alginate that would then exit the microcatheter tip. A handle designed to simultaneously inject the alginate solution and the calcium chloride, at an equal rate, was also provided. Injections were very slow, starting at the fundus, with periods of observation, since the inertia of the alginate string often caused an important delay between the end of the manual injection and extrusion of the alginate string. To end the embolization, the trigger on the alginate solution was removed, resulting in injection of calcium chloride only through one of the lumen, and cutting of the proximal end of the alginate string still present in the distal common channel. Because injection of alginate

without protection at the neck often led to stray emboli, we next explored strategies to improve the safety of endovascular alginate delivery. Lateral wall aneurysms (n = 16 in 6 pigs and 2 dogs) were used to compare stray embolization during alginate alone delivery (n = 4) with injections under the protection of balloons (n=4) (Sentry, Target Therapeutics, Fremont, CA, USA) in the parent artery or using a single intra-aneurysmal GDC coil (n=8). Canine bifurcation aneurysms (n = 4) were also used to study alginate injection under the protection of a single intra-aneurysmal coil. For alginate deposition under coil protection, a 0.010-inch calibre platinum coil (7 to 10 mm x 20-30 cm, GDC 10, (Target Therapeutics, Fremont, CA, USA), depending on aneurysm size, was first positioned inside the aneurysm with 1 to 3 loops crossing the neck. Alginate embolization was then performed as described above.

4) Angiography

Surgical embolization of aneurysms and healing at the neck of the aneurysms were assessed *in vivo* by angiography, immediately after embolization, and before sacrifice at 3 weeks. Results were scored according to a previously described classification [14]. A score of 0 indicated complete obliteration; 1, “dog ears”; 2, residual or recurrent neck; and 3, residual or recurrent aneurysm.

5) Pathology

Carotid angiography was repeated in anesthetized animals, before euthanasia by barbiturate overdose, to document the degree of aneurysmal obliteration. The common carotid artery was excised after sacrifice. The wall of the artery was longitudinally opened to expose the luminal surface of the neck of the aneurysm. After fixation, the necks of aneurysms were photographed using an operating microscope. The aneurysms were then sectioned in the axial plane and photographed again before paraffin embedding. Healing phenomena at the neck of aneurysms, at the surface of alginate

blocks, or sponges, and the presence of endothelialized clefts between the embolic agent and the aneurysmal wall were studied after formalin fixation, axial sectioning, and staining with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) and Movat's pentachrome stain. Neointimal thickness was measured when possible, in 5 different areas of a mid-axial section, as described [7]. Immunohistochemistry served to characterize neointimal cells and cells inside the sponge at different time intervals after embolization, using antibodies to smooth muscle α -actin and factor VIII [7, 14].

6) Statistics

Angiographic scores were compared using Wilcoxon's tests. Mean neointimal thickness was compared using Student's t tests.

3. Results

a) Cross-linking of alginate

In vitro cross-linking of alginate with CaCl_2 was consistent and reproducible. The average weight of alginate blocks was about $0.2164 \pm 0.0261\text{g}$ and the average optical density was $0.5787 \pm 0.1566\mu\text{m}$.

b) Alginate as a vehicle for growth factor delivery

The binding efficiency of alginate for PDGF-BB was very variable (10-50% for a mean of 23%). Because of this wide variability, alginate pellets kept for 5 days in PBS have a similar range of activities to pellets at time 0, rendering assessment of elution impossible. The binding efficiency of alginate for TGF- β_1 was less variable, with a mean of $63\% \pm 13\%$; there was rapid elution during the first hours followed by a near plateau

at 22% for 5 days. The TGF- β_1 remaining into *in vitro* alginate pellets expressed as % of value at time 0 is illustrated in figure 2a.

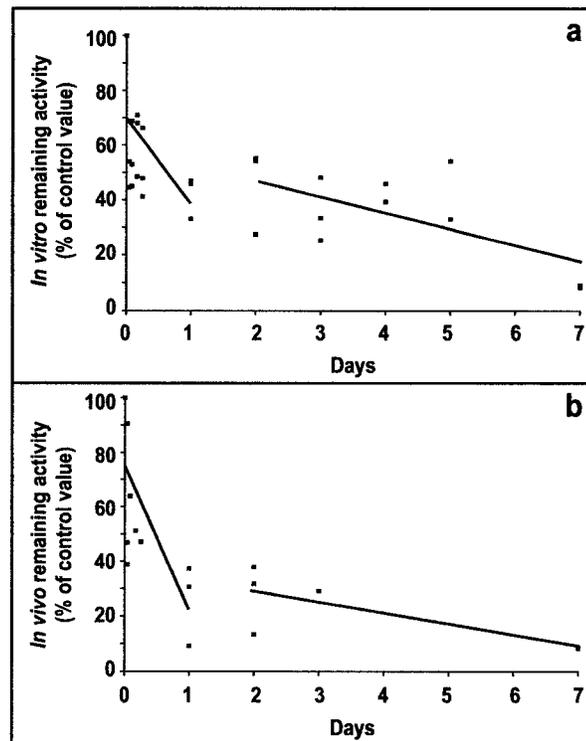


Figure 2. *In vitro* and *in vivo* clearance of TGF- β_1 . *a*) Blocks of alginate containing TGF- β_1 were kept *in vitro* and removed after 10 minutes to 7 days. The remaining activity was measured by scintillation counting, and the results are expressed as percentage of control activity. *b*) Blocks of alginate containing TGF- β_1 were inserted in experimental aneurysms and removed after 10 minutes to 7 days. The remaining activity was measured by scintillation counting, and the results are expressed as percentage of control activity of blocks kept *in vitro* for identical time periods. *In vitro* and *in vivo*, the clearance of TGF- β_1 followed 2 phases: an initial rapid clearance (slope a) and a second slower phase (slope b).

The elution profile of TGF- β_1 for alginate pellets introduced inside *in vivo* aneurysms is illustrated in figure 2b. At 1 and 24 hours, 50-80% of delivered TGF- β_1 had eluted from the alginate block. Only 6% remains inside aneurysms at 1 week.

c) Angiographic results and neointima thickness

Median angiographic scores and neointima thickness for all groups are summarized in Table 1.

Table 1. Alginate, angiographic scores and neointima thickness

| Group | Aneurysm type | Embolic agent | Number of aneurysms | Median angiographic scores | | Neointima thickness (μm) |
|-----------|---------------------|--|---------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| | | | | T ₀ | T _{3 weeks} | |
| Group I | Canine lateral wall | Alginate + ¹²⁵ I/TGF- β | 16 | - | - | - |
| Group II | Canine lateral wall | Gelfoam sponge | 4 | 3 | 3 | 94 \pm 90 |
| | Canine lateral wall | Sponge + alginate | 4 | 1 | 1 | >1000 |
| Group III | Porcine aneurysms | Alginate | 12 | 2.5 | 1 | >1000 |
| Group IV | Canine lateral wall | Alginate | 4 | 2 | 2.5 | NA |
| | Canine bifurcation | Alginate | 4 | 2 | 0 | NA |
| Group V | | Alginate | 8 | 3 | 2 | 238 \pm 226 |
| Group VI | Canine lateral wall | a) Alginate block | 10 | 3* | 1* | 255 \pm 142** |
| | | b) Alginate block + PDGF-BB | 5 | 3 | 0 | 565 \pm 457** |
| | | c) Alginate block + TGF- β_1 | 5 | 3 | 2 | 680 \pm 543** |

d) Effects of the addition of an alginate coating on intraoperative sponge embolization

In each animal, one lateral wall aneurysm was packed with a bare sponge and the controlateral aneurysm was packed with the same sponge coated with a layer of alginate. The addition of alginate completely changed the biology of the canine model. Angiographic scores were improved initially and at 3 weeks as compared to aneurysms treated with bare sponges (Table 1). Pathological findings at the neck of aneurysms treated with Gelfoam sponges have been described [14, 15, 17]; in brief, the sponge was covered by a thin neointimal layer (mean $94 \pm 90 \mu\text{m}$), continuous with recanalizing crescents. Aneurysms treated with alginate-coated sponges no longer showed visible alginate material. Recanalizing crescents were found in one of four specimens; they were absent in the others. A thick neointima, continuous with dense collagenous tissue was found between the arterial lumen and the sponge, to such an extent that neointimal thickness could no longer be measured with accuracy. Inflammatory changes were similar for both groups.

e) Intraoperative alginate embolization with double lumen microcathéter

When alginate was injected peroperatively through the fundus under the protection of a surgical clip at the neck of aneurysms, angiography showed a wide residual neck and opacification of a portion of the sac postoperatively. Three of 8 animals suffered embolic events 3 to 8 days after surgery. Follow-up angiograms performed at the time of neurological deficits documented the presence of emboli within carotid arteries. Pathology showed alginate within these emboli in all cases. Angiographic scores at 3 weeks were improved as compared to initial scores ($p=0.066$) (Table 1). The neointima was present in all specimens and measured a mean of $238 \pm 226 \mu\text{m}$.

Four canine lateral wall aneurysms embolized with ^{85}Sr -labeled alginate showed a localized area of high gamma activity at the level of the aneurysm that could be clearly followed until the time of sacrifice at 3 weeks. After 24 hours, there was no significant activity at the level of the urinary tract or skeleton.

f) Intraoperative alginate block embolization with or without growth factors

When alginate blocks, with or without growth factors, were used for intraoperative embolization of lateral wall canine aneurysms, there was progressive occlusion of residual lesions with time (see Table 1 and figure 2). Angiographic scores were significantly better at 3 weeks that initially ($p=0.039$). The alginate block was shown as a well “encapsulated material”, unmixed with clot, surrounded by thick fibrotic tissue (Figure 3). The collagenous tissue was again continuous with the neointima that sealed the neck, so that neointimal measurements were sometimes difficult to estimate with accuracy.

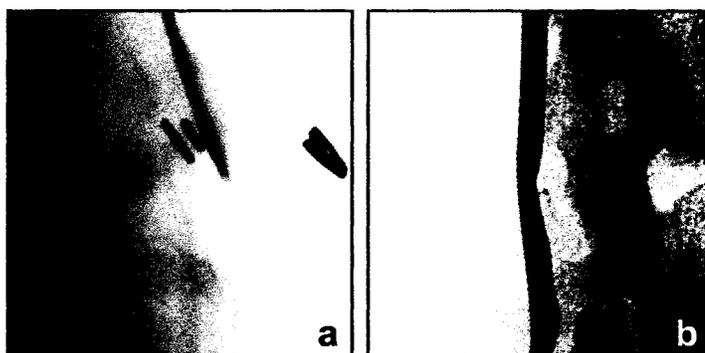


Figure 3. Angiographic evolution after alginate embolization. Selected views from carotid angiograms performed immediately (a) and 3 weeks (b) after intraoperative Gelfoam block embolization without growth factors. Note progressive obliteration of residual lesion with time.

There was no significant difference in the angiographic evolution of lesions treated with alginate containing PDGF-BB, TGF- β_1 or alginate alone (Table 1). The neointimal thickness at the surface of alginate blocks did not show any significant difference between alginate containing or not PDGF-BB or TGF- β_1 .

g) Endovascular alginate embolization of aneurysms

The injection of alginate, with the double lumen microcatheter, without any protection at the neck, led to carotid emboli in 3 of 4 lateral wall porcine aneurysms in which it was attempted, with carotid occlusion in one case.

The use of a single coil before alginate injection could improve control of alginate embolization in 7 of 10 lateral wall aneurysms (8 porcine, 2 canine). Carotid emboli still occurred in 3 of 10 when the material reached the neck of aneurysms (Figure 4).

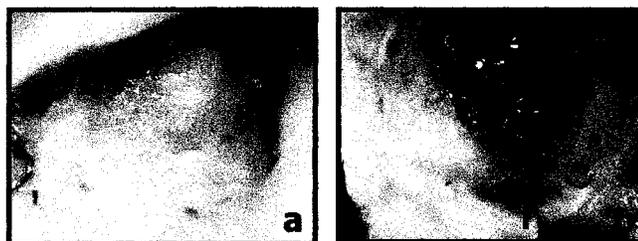


Figure 4. Neointima formation after alginate embolization. Macrophotography of neointimal coverage of the neck of the aneurysm 3 weeks after intraoperative alginate block embolization, 'en face' (a) and after axial section (b). Note thick neointima between arrows in (b).

In the more difficult canine bifurcation aneurysm model, the use of a single coil to control alginate delivery failed in 2 of 4 aneurysms, leading to neurological deficits and early sacrifice in 2 animals.

When a balloon was temporarily occluding the neck of lateral wall aneurysms during alginate deposition, embolization was more controlled. However, aneurysm filling was incomplete in 2 aneurysms. Difficulties were encountered at properly cutting the alginate string at the end of embolization in 2 cases, leading to protrusion of embolic material inside the carotid artery (Figure 4). Alginate emboli also occurred in one dog 48 hours after successful embolization, leading to a neurological deficit and early sacrifice. Pathological studies after endovascular injection of alginate were reminiscent of coil embolization, with fibrous tissue replacement of spaces located between “alginate coils” (Figure 4). Neointima formation at the neck was of variable thickness, continuous with recanalizing corners, and thus was impossible to measure with accuracy.

None of the pigs presented a neurological deficit after embolization. Control angiography performed 2 weeks after embolization did not show any change in the position of the embolic material that seemed stable once properly deposited inside porcine aneurysms. Pathological studies revealed the formation of a thick neointima at the surface of the embolic agent (Figure 5). There was fibrous tissue between “alginate coils”. There were no recanalizing corners.

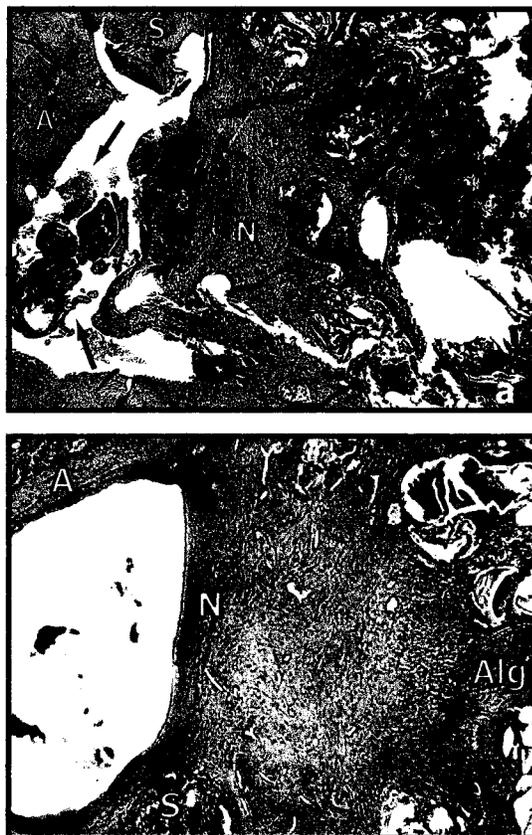


Figure 5. Pathology after alginate embolization. a) Microphotography of axial section of canine lateral wall aneurysm 3 weeks after endovascular alginate embolization. Alginate is seen as black material. The neck is covered by a neointima of variable thickness. Some alginate covered with neointimal tissue protrudes inside the carotid artery (arrows). Hematoxylin and eosin; original magnification X20. b) Photomicrography of an axial section of a lateral wall porcine aneurysm 3 weeks after endovascular alginate embolization. Note very thick neointima (green) continuous with fibrous replacement of clot surrounding 'alginate coils'. (Alg = Alginate within partially organized clot) (Movat's pentachrome stain; original magnification X20) (A = carotid arterial wall; N = region of the neck of the aneurysm; S = suture between carotid and aneurysm).

4. Discussion

a) Experimental models

We have used various models to address specific issues of this research program. The search for a sophisticated delivery system may be futile if the candidate embolic agent shows no potential benefits regarding aneurysmal healing after endovascular treatment. Thus we believe it is useful to explore the angiographic evolution and the pathological changes after a peroperative technique that does not necessitate the development of such a delivery system and in which results do not vary with its safety or efficacy. Each model has advantages and drawbacks. The reliability of alginate cross-linking, the growth factors binding capacity and elution profiles of the alginate's formulation were first tested *in vitro*. However, growth factors elution from intra-aneurysmal alginate may significantly differ from *in vitro* data. Because growth factor containing alginate blocks were prepared *in vitro* and peroperatively introduced into aneurysms, the amount of growth factor introduced inside aneurysms at the beginning of the experiment was precisely known, and the radioactivity recovered at various time points did not depend on the success of alginate delivery, which would have been the case had the study been performed using an endovascular technique.

We have extensively studied a peroperative Gelfoam sponge embolization model, which has a propensity to recur in dogs. We have previously studied the effects of growth factors on neointima formation using this model [7]. Coating the sponge with the test substance is an elegant way to assess its potential benefits without having to design a specific delivery system [18]. Results are however difficult to interpret because of the confounding presence of the sponge. A peroperative embolization strategy using alginate blocks was also used to assess the effects of the addition of growth factors on angiographic results and neointima formation with minimal variability between embolized aneurysms as compared to endovascular techniques. Certain characteristics

of the embolic agents, such as concentration, strength, adhesiveness, viscosity, could be modified to improve transcatheter delivery, but may affect the stability of the agent once it is delivered. Intraoperative injections with a dedicated delivery catheter through the fundus, under the protection of a surgical clip at the neck, are useful to test the stability of the embolic agent once it is reliably polymerized inside the aneurysm.

These models however cannot predict accurately the behaviour of the embolic agent during transcatheter delivery. To assess the safety and efficacy of the delivery system, lateral wall porcine aneurysm models have been frequently used. These aneurysms have, however, a strong propensity to heal, even when embolization is incomplete [15, 19]. Lateral wall canine aneurysms are more appropriate in that respect, and permitted assessment of protection of the neck of aneurysms with balloons. Canine bifurcation aneurysms provide a better evaluation of the embolic agent and delivery system, because they more closely mimic human aneurysms, and have a stronger tendency to recur [20].

b) Alginate for endovascular embolisation

Endovascular alginate delivery using a double lumen microcatheter was possible, and an alginate “string” was consistently formed and deposited within the aneurysmal lumen. However, because of lack of adhesive properties, and because of its softness, the alginate string could be carried by blood flow into the parent artery, a clearly dangerous event in clinical practice. Balloon occlusion of the parent artery and of the neck of the aneurysms could prevent stray emboli into the carotid artery at the time of deposition. Complete alginate replacement of the blood trapped inside the aneurysm was however difficult to achieve, resulting in only partial embolization of the aneurysms; when more complete embolization was attempted, alginate could still escape into the carotid artery, probably because sealing of the neck by the balloon was imperfect. A perfect and ‘watertight’ seal, probably difficult to achieve in clinical practice, may not be desirable

to prevent excessive intraaneurysmal pressures during injections. The placement of a single coil inside the aneurysm to retain alginate after deposition led to improved control, but due to its softness, the alginate “string” was able to find its way through the coil loops to escape into the parent vessel in some cases particularly in high flow bifurcation aneurysms. These difficulties in controlling polymer deposition were also encountered when we attempted to use cyanoacrylate for aneurysmal embolization, and may be shared by many polymeric substances [21-22]. Once it protruded or escaped to the parent vessel, the alginate string could sometimes be reaspirated, but the security afforded by the retrievable nature of detachable coils will be difficult to achieve with polymers, in our opinion.

Even if we could deposit alginate inside aneurysms with full control, the stability of the embolic agent was insufficient for a safe application. This instability was demonstrated by the experiment using a surgical clip to ensure complete control of alginate deposition (group IV). Once the carotid artery was reopened, blood flow at the neck of aneurysm caused fractures in the alginate mass, with delayed embolic complication in 3 of 8 dogs. Clearly the formulation should be modified to add strength and/or adhesiveness of the polymer [23].

This experiment also emphasized the need to use appropriate animal models to test safety of embolic materials. None of the porcine aneurysms have shown delayed embolic complication following alginate embolization, an observation probably linked to the propensity for extensive thrombosis of this species. The thick thrombus formed at the neck of porcine aneurysms probably prevented blood flow from breaking and carrying the polymeric material. This was not the case in canine aneurysms, and this weakness of the polymer became obvious with the use of this model. We conclude that neither safety nor efficacy of embolic materials can be tested reliably in porcine models.

c) Healing after alginate embolisation

We did not study a sufficient number of animals and the observation period was too short to assess long-term results of alginate embolization or the incidence of recurrence. However, alginate coating of gelatin sponges appeared to change the biology of the model in favor of healing at 3 weeks. When alginate was injected preoperatively or a block was directly introduced, angiographic results improved with time, and recanalizing crescents were absent at pathology.

However, endovascular alginate embolization led to the formation of a mass of alginate “strings” mixed with entrapped clot (Figure 4). Basically, this conformation was similar to coil embolization, where the clot can be subjected to the recanalization process [24]. The endovascular technique used for alginate deposition should be designed to fill as completely as possible the aneurysmal cavity, to prevent recanalization of the clot that could be trapped within or at the surface of the polymeric mass. Again this could be a difficult goal to achieve with any transcatheter polymeric embolization [20].

d) Potential applications for growth factor delivery and in situ beta radiation

Growth factor binding and intra-aneurysmal delivery was possible with alginate, but growth factor elution from the polymer was rapid. Kinetics of growth factor delivery with alginate were not significantly different from experiments performed with a Gelfoam sponge as the vehicle [7]. Although optimal doses and dose rates of growth factors necessary to improve healing after endovascular treatment remain to be defined, we had hoped for a more sustained delivery. We have previously shown the formation of a thicker neointima with the use of PDGF-BB and TGF- β_1 in porcine aneurysms, but no effect on canine aneurysms, which showed very thin neointimas and recurrences at 3 weeks [7]. Because the tendency of our intraoperative model for recurrences was lost when the Gelfoam sponge was replaced with an alginate block, and because of

exuberant neointima formation, the potential added value of growth factors could not be demonstrated.

Replacement of the calcium ions, used to polymerize alginate, by radioactive strontium can easily be performed. We could demonstrate the feasibility of this strategy, using only diagnostic quantities of ^{85}Sr to dope the CaCl_2 solution used for alginate polymerization. Retention of radioactivity within treated aneurysms could be demonstrated up to the time of sacrifice at 3 weeks, showing the feasibility of alginate embolization as a technique for *in situ* β -radiation to prevent recanalization [6].

4. Conclusion

Alginate embolization of aneurysms is currently unsafe and formulation changes are necessary to increase stability of the polymer. Control of alginate deposition also needs to be refined before contemplating a clinical application. Alginate could offer a mean to deliver growth factors that could encourage healing phenomenon after embolization, but this potential could not be verified in our animal model. Local *in situ* beta-radiation could be performed using ^{85}Sr in the CaCl_2 solution.

Acknowledgment

We thank Guylaine Gevry for her assistance with the preparation of the manuscript and artwork. This work was supported by a grant from Boston Scientific Corporation, and also partially supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec, Heart and Stroke Foundation of Canada and Canadian Institutes for Health Research.

References

1. Raymond J, Roy D. Safety and efficacy of endovascular treatment of acutely ruptured aneurysms. *Neurosurg* 1997 Dec;41(6):1235-1245.
2. Murayama Y, Viñuela F, Suzuki Y, *et al.* Ion implantation and protein coating of detachable coils for endovascular treatment of cerebral aneurysms: concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurg* 1997; 40 :1233 –1244.
3. Raymond J, Roy D, Bojanowski M, Moundjian R, L'Espérance G. Endovascular treatment of acutely ruptured and unruptured aneurysms of the basilar bifurcation. *J Neurosurgery* 1997; 86 :211 –219.
4. Feuerberg I, Lindquist C, Lindquist M, Steiner L. Natural history of postoperative aneurysm rests. *J Neurosurg* 1987; 66 :30 –34.
5. Lin T, Fox AJ, Drake CG. Regrowth of aneurysm sacs from residual neck following aneurysm clipping. *J Neurosurg* 1989; 70 :556 –560.
6. Raymond J, Leblanc P, Desfaits AC, Salazkin I, Morel F, Janicki C, Roorda S. *In situ* beta radiation to prevent recanalization after coil embolization of cerebral aneurysms. *Stroke*. 2002 Feb;33(2):421-427.
7. Desfaits AC, Raymond J. Growth factors stimulate neointimal cells *in vitro* and increase the thickness of the neointima formed at the neck of porcine aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 2000; 31: 498–507.
8. Roeck-Holtzhauer YG. Uses of Seaweeds in Cosmetics. In: *Seaweed Resources in Europe, Uses and Potential* (Guiry M. D., Blunden G., eds.). John Wiley & Sons, Sussex ; 1991 :83-93.
9. Doubleday B. Impression materials. *British Journal of Orthodontics*. 1998; 25: 133-140.
10. Read TA, Farhadi M, Bjerkvig R, Olsen BR, Rokstad AM, Huszthy PC, Vajkoczy P. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer Res*. 2001; 61(18):6830-6837.

11. Becker TA, Kipke DR, Preul MC, Bichard WD, McDougall CG. In Vivo Assessment of Calcium Alginate Gel for Endovascular Embolization of a Cerebral Arteriovenous Malformation Model Using the Swine Rete Mirabile. *Neurosurg* 2002; 51(2):453-459.
12. Abruzzo T, Cloft HJ, Shengelaia GG, Waldrop SM, Kallmes DF, Dion JE, Constantinidis I, Sambanis A. *In vitro* effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres. *Radiology*. 2001 Aug;220(2):428-435.
13. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, Gold JP, Simons M. Local Perivascular Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery : Results of a Phase I Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Circulation*; 100: 1865-1871.
14. Raymond J, Desfaits AC, Roy D. Fibrinogen and vascular smooth muscle cell grafts promote healing of experimental aneurysms treated by embolization. *Stroke*. 1999;30:1657-1664.
15. Raymond J, Venne D, Allas S, Roy D, Oliva VL, Denbow N, Salazkin I, Leclerc G. Healing mechanisms in experimental aneurysms. I. Vascular smooth muscle cells and neointima formation. *J Neuroradiol*. 1999 Mar;26(1):7-20.
16. Graves VB, Partington CR, Rufenacht DA, Rappe AH, Strother CM. Treatment of carotid artery aneurysms with platinum coils: an experimental study in dogs. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1990 Mar-Apr;11(2):249-252.
17. Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, Brazeau P. Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. *J Neuroradiol*. 1999 Jun;26(2):92-100.
18. Metcalfe A, Desfaits AC, Salazkin I, Yahia L'H, Sokolowski W, Raymond J. Cold Hibernated Elastic Memory foams for endovascular interventions. *Biomaterials* 2003; 24(3): 491-497

19. Byrne JV, Hope JKA, Hubbard N, Morris JH. The nature of thrombosis induced by platinum and tungsten coils in saccular aneurysms. *Am J Neuroradiol.* 1997 Jan;18:29-33.
20. Raymond J, Berthelet F, Desfaits AC, Salazkin I, Roy D. Cyanoacrylate embolization of experimental aneurysms. *Am J Neuroradiol.* 2002 jan;23:129-138.
21. Macdonald RL, Mojtahedi S, Johns L, Kowalczyk A. Randomized comparison of Guglielmi detachable coils and cellulose acetate polymer for treatment of aneurysms in dogs. *Stroke.* 1998 Feb;29(2):478-485.
22. Murayama Y, Vinuela F, Ulhoa A, Akiba Y, Duckwiler GR, Gobin YP, Vinters HV, Greff RJ. Nonadhesive liquid embolic agent for cerebral arteriovenous malformations: preliminary histopathological studies in swine rete mirabile. *Neurosurgery.* 1998 Nov;43(5):1164-1175.
23. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001;22(6):511-521.
24. Raymond J, Sauvageau E, Salazkin I, Ribourtout E, Gevry G, Desfaits AC. Role of the endothelial lining in persistence of residual lesions and growth of recurrences after endovascular treatment of experimental aneurysms. *Stroke.* 2002 Mar;33(3):850-5.

ANNEXE 2. 3^e ARTICLE: Temporary vascular occlusion with poloxamer 407. Sous presse dans Biomaterials.

Temporary vascular occlusion with poloxamer 407

Jean Raymond^a, Annick Metcalfe^{a,b}, Igor Salazkin^a, Alexander Schwarz^c

- ^a Interventional Neuroradiology Laboratory, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Mailloux Pavilion M-8206, 1560 Sherbrooke East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada
- ^b Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, PO Box 6079, Montreal, Quebec H3C 3A7, Canada
- ^c Biosphere Medical, Inc., 1050 Hingham Street, Rockland, MA 02370, USA

Corresponding author:

Jean Raymond

Interventional Neuroradiology Laboratory,

CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Mailloux Pavilion M-8206,

1560 Sherbrooke East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada

Tel.: (514) 890-8000 ext. 27235

Fax: (514) 412-7603

Email:

dr_jean_raymond@hotmail.com

Abstract

There is a need for safe and reversible occlusions during percutaneous endovascular procedures. Poloxamer 407 is a non-ionic surfactant with rapid reversible sol-gel transition behavior. The safety and efficacy of this polymer as a temporary embolic agent was investigated. First, dissolution time after gelation of poloxamer was determined in an *in vitro* model. Then, transient poloxamer occlusion of renal and pulmonary arteries of 7 dogs was followed by serial angiograms. Macroscopic and pathological changes were studied one week later. This experiment was repeated in similar arteries in 1 pig, and in auricular arteries of 2 rabbits. Poloxamer dissolution after *in vitro* polymerization was completed within 1-20 hours, depending on concentrations. *In vivo* poloxamer 22% injections led to complete occlusion, followed by full recanalization within 10-90 minutes without complication. The only biochemical effect of poloxamer occlusions was transient elevation of triglyceride levels. There were no pathological abnormalities at one week. Poloxamer 407 could be used as a safe and reliable embolic material for temporary occlusions.

Keywords: poloxamer; endovascular; occlusion; inverse thermosensitivity; surfactant.

1. Introduction

Percutaneous endovascular techniques, such as angioplasty or stenting, usually consist in restoring the patency of diseased vessels. Less frequently, the goal of the intervention is to permanently occlude vascular structures. During such procedures, commonly called embolizations, there may be a need to temporarily occlude normal vessels or branches, to redirect flow-driven particles, or to protect a normal vascular bed from penetration by the embolic agent or from exposure to a cytotoxic drug. In such occasions, it would be beneficial to use an occlusive agent that has a temporary action. This agent should be atraumatic, non-thrombogenic, and the occlusion should be reliably reversible.

Triblock (ABA) copolymers of polyethylene oxide_a-polypropylene oxide_b-polyethylene oxide_a [PEO_a-PPO_b-PEO_a], also termed poloxamers (or Pluronic), are nonionic surfactants [1] widely used in diverse industrial applications. Their surfactant property has been useful in detergency, dispersion, stabilization, foaming, and emulsification [2]. Some of these polymers have been considered for various cardiovascular applications, as well as in sickle cell anemia [3-5]. Two polymers from this class, poloxamer 188 and poloxamer 407, show inverse thermosensitivity [6,7]; therefore, they are soluble in aqueous solutions at low temperature, but will gel at higher temperature. Formulations can be designed to allow the injection of a liquid form, through a small catheter, which will gel at body temperature. The use of such a material as a temporary vascular occlusive agent was explored here. The experiments reported below show that intravascular poloxamer injections lead to safe, reliable, and controlled occlusions, which are always reversible.

2. Materials and methods

2.1. Experimental Design

An in-vitro model was used to study the time of dissolution of gels of various concentrations (14-24% (w/w)) of poloxamer. To assess the reliability of arterial occlusions, to determine the periods of occlusion and dissolution *in vivo*, as well as to explore potential consequences of pulmonary embolization, which could occur in the treatment of arteriovenous malformations or fistulae, one renal and one lower lobe pulmonary artery were embolized with 3 ml of poloxamer 22% (w/w) in 7 animals. Angiographic changes until restoration of normal flow, as well as pathological changes after 1 week were studied. Poloxamer injections were repeated immediately before sacrifice in 5 carotid arteries, 3 femoral arteries and 3 common iliac veins in the same animals. To explore potential endovascular applications, cyanoacrylate embolization was performed after poloxamer occlusion immediately before sacrifice in 4 of these animals. To assess if poloxamer dissolution was dependent on the species or the model, embolization of porcine renal, femoral, iliac, and pulmonary arteries in one animal, and temporary occlusion of the central auricular artery in 2 rabbits were also performed.

2.2. Polymer Formulation

The purified poloxamer 407 (Hinsbar Laboratories, Clawson, MI, USA) was added slowly to ice cold saline under stirring at twice the desired concentration for the final formulation. As the poloxamer started to go into solution ice-cold contrast agent (OmnipaqueTM 300, Amersham Health, Princeton, NJ, USA) was added to the final volume. The initial slurry was stirred overnight in an ice bath and then sterilized by ultrafiltration. For *in vitro* experiments, a drop of food coloring was added to aid the visual assessment of dissolution.

2.3. *In vitro* model

The *in vitro* model consisted of a 5 ml column filled with glass beads of 200–400 μm size, mimicking a capillary bed (Fig 1a). The column, immersed in a heated water bath at 38°C, was perfused at a flow rate of 400 ml/min using a Harvard pump. A bypass around the column was used for flow diversion around the occlusion. In a typical experiment, 1 ml of the polymer solution was injected via a coaxial catheter 2 centimeters from the top of the glass column. Time to dissolution was determined visually by the disappearance of the gel and reestablishment of flow through the column.

2.4. Pharmacokinetic study of soluble poloxamer

To determine the half-life of the poloxamer *in vivo* after dissolution, blood was collected from one dog 15 minutes to 120 hours after occlusion of the right lower lobe pulmonary artery with 3 ml of poloxamer 22% (w/w). The plasma concentration of poloxamer 407 was determined by HPLC. Briefly, poloxamer 407 was quantitatively recovered from plasma aliquots by repeated extraction with tetrahydrofuran. The extracts were combined and the solvent removed by evaporation under reduced pressure. The residue was re-dissolved in an accurately known volume of tetrahydrofuran, a derivatization reagent containing an UV absorbing chromophore added, and the reaction was allowed to proceed to completion. The poloxamer derivative was separated from excess derivatization reagent and plasma components by gel permeation chromatography (GPC-HPLC) and visualized using UV detection. The amount of poloxamer 407 present in the plasma was quantified by comparison of the poloxamer derivative peak area to that of a series of similarly prepared external standards. Limit of detection was approximately 2 ug poloxamer 407 per ml of plasma.

2.5. *In vivo* vascular occlusion

Protocols for animal experimentation were approved by the Institutional Animal Care Committee in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. All endovascular procedures were performed under general anesthesia. Eight Beagles weighing 10 to 15 kg were sedated with an intramuscular injection of acepromazine (0.1 mg/kg), glycopyrrolate (0.01 mg/kg), and butorphanol (0.1 mg/kg), and anesthetized with intravenous thiopental (15 mg/kg). Animals were ventilated artificially and maintained under surgical anesthesia with 2% isoflurane. Poloxamer 22% was kept on ice during interventions. Saline containing syringes were also kept on ice to cool the catheter immediately before poloxamer injections. We first used a coaxial 2/3-F catheter system, but cooling by perfusion of cold saline in the outer catheter was insufficient to

compensate for the smaller diameter of the microcatheter, leading to slow injections, inefficient embolizations, and premature gelation within the microcatheter. Rapid injection through 5-F catheter was then elected for most embolizations (Balt, Montmorency, France). Catheterization was performed by percutaneous transfemoral venous and arterial approaches using 5F introducer sheaths (Cordis Corporation, Miami, FL, USA). Animals were subjected to temporary occlusion of the right interlobar pulmonary artery and right renal artery by injection of approximately 3 ml of poloxamer 22%.

All vascular occlusions were serially studied by angiography performed 5, 10, 20 or 30 minutes after embolization and after dissolution of the material. A controlateral renal angiogram was performed in all animals to compare angiographic arterial and parenchymal phases after poloxamer dissolution to the normal kidney. Automated coagulation time was measured before and immediately after each procedure in 6 dogs using blood drawn from the femoral sheath. Follow-up angiographic studies were repeated at one week to exclude any delayed effects such as neointima formation at the level of the arteries submitted to transient occlusions. Temporary occlusions of various other vascular sites were explored immediately before sacrifice, to avoid clinical complications that could occur even with transient occlusions. These include lumbar and hepatic arteries, circumflex femoral veins, and most frequently the left common carotid artery (n = 5). Occlusion of large veins including iliac veins (n = 3) and cava (n = 3) were also attempted, for venous applications. It was also, at the time of this follow-up angiogram, that exploration of potential endovascular applications were performed. Cyanoacrylate was injected through 2F microcatheters (Target Therapeutics Inc., Boston Scientific Corporation, Fremont, CA, USA) positioned proximal to poloxamer occlusions, to test if the glue could infiltrate the poloxamer, or penetrate between the poloxamer and the vessel wall (n = 4). Femoral arteries were also temporarily occluded (n = 3) at the time of catheter retrieval to explore the potential of poloxamer as a femoral closure agent after angiography.

Poloxamer occlusions were also tested in 2 rabbits and 1 pig, to assess if reliable transient occlusions with poloxamer were specific to the species studied. Embolization of porcine renal, femoral, internal iliac and pulmonary arteries in one animal was performed using the same techniques as described above in dogs. Temporary occlusion of the central auricular artery was also studied in rabbits. Two New-Zealand rabbits weighting 2.5-3.0 kg were sedated with an intramuscular injection of acepromazine (0.75 mg/kg) and glycopyrrolate (0.01 mg/kg). Preoperative analgesia was provided with EMLA cream (lidocaine 2.5% and prilocaine 2.5%, AstraZeneca LP). The central artery of the ear was catheterized and embolized with 0.05 and 0.1 ml of poloxamer 22 % after contrast angiography. The appearance, blood flow and recovery of the artery and status of the ear were assessed and compared to the controlateral ear injected with normal saline only.

2.6. Laboratory investigations

Routine hematology and biochemistry multianalyses were performed in 4 dogs immediately before and after the procedure, at 24 hours and one week.

Because many physiological values are disturbed by fasting, anesthesia, angiography, and recovery period, routine laboratory tests were compared to 6 other dogs submitted to platinum coil embolization. Statistical comparisons were made with Independent-Samples T tests.

2.7. Autopsy

Macroscopic photography of the main arteries and of the end organs was performed at the time of autopsy. Pathological studies were performed on tissue blocks from samples of any visible abnormality, and on random sampling in organs without abnormality.

Slides were stained with hematoxylin-phloxin-saffron and Movat's pentachrome stain. Each slide was studied in parallel with a control slide prepared from the artery, vein, or end-organ from the side controlateral to the poloxamer injections.

3. Results

3.1. *In vitro* dissolution

Dissolution time of poloxamer 407 according to concentration is illustrated in Fig 1b. As a rule, dissolution *in vitro* was much delayed as compared to *in vivo* experiments. For example, the 22% (w/w) concentration was found to occlude *in vivo* arteries for 10-90 minutes, while *in vitro* occlusions lasted more than 8 hours.

3.2. *In vivo* pharmacokinetics of poloxamer after dissolution

Plasma concentrations of dissolved poloxamer 407 after transient occlusion of right pulmonary artery with 3 ml are shown in Fig 2. Poloxamer 407 could not be detected in plasma after 100 hours.

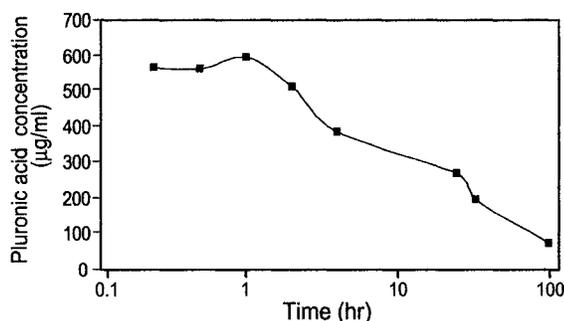


Figure 2. Plasma concentrations of poloxamer 407 after dissolution. Graphic illustration of plasma concentrations of poloxamer 407 10 minutes to 120 hours after embolization of right pulmonary artery in one animal (see text for details).

3.3. *In vivo* temporary occlusions

All interlobar pulmonary arteries could be occluded, and reliably recanalized within 10 to 20 minutes. The shortest occlusion times were associated with sub-occlusions, the longer times to more complete filling of the vascular lumen from distal to proximal.

The renal artery could be completely occluded in all cases. Recanalization occurred at 10 to 80 minutes, often a slightly longer time of occlusion than the one seen at the level of the pulmonary artery. The embolization did not cause any radiographic abnormality and renal angiograms were symmetrical after dissolution (Fig 3).

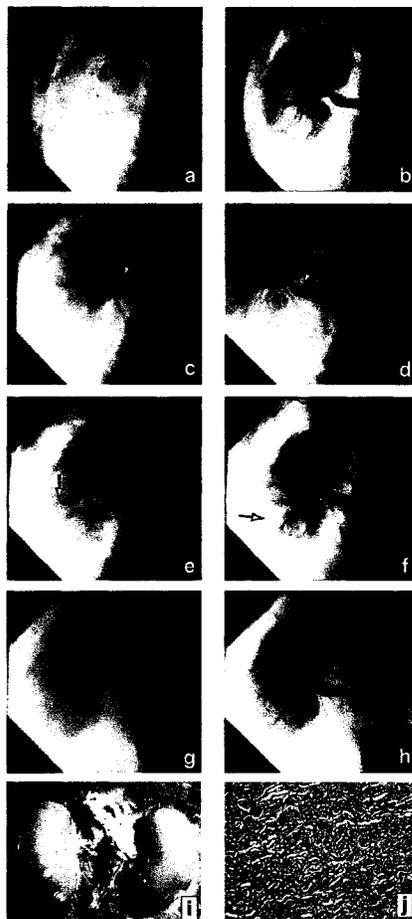


Figure 3. Poloxamer embolization of right renal artery. Selected views from renal angiograms (a-h) with (b, d, f, h) or without (a, c, e, g) contrast injection before (a, b), 5 minutes (c, d), 10 minutes (e, f) and 30 minutes (g, h) after embolization with 3 ml of poloxamer 22%. Note complete cast of renal branches at 5 minutes (arrows in c, d) with near complete dissolution at 10 minutes (e). A small branch remains occluded at 10 minutes (arrow in e) resulting in a nephrographic defect (arrow in f). The kidney is completely normal at 30 minutes. Macroscopic and pathological studies at one week showed no parenchymal abnormality (i, j). (j: hematoxylin-phloxine-saffron staining; original magnification x50).

Lungs and kidneys were macroscopically intact at autopsy (Fig 3). The pulmonary or renal arteries did not show histopathological abnormalities. Small focal areas of neointimal thickening were found as frequently on the controlateral side as on the side of poloxamer injections, and were attributed to catheter trauma. The renal and pulmonary parenchymas were normal one week after transient arterial occlusion by poloxamer.

The carotid arteries were occluded with poloxamer immediately before sacrifice. The polymer could be found at direct inspection at autopsy. There was no visible change of the lining of the vessel as compared to the controlateral artery (Fig 4).

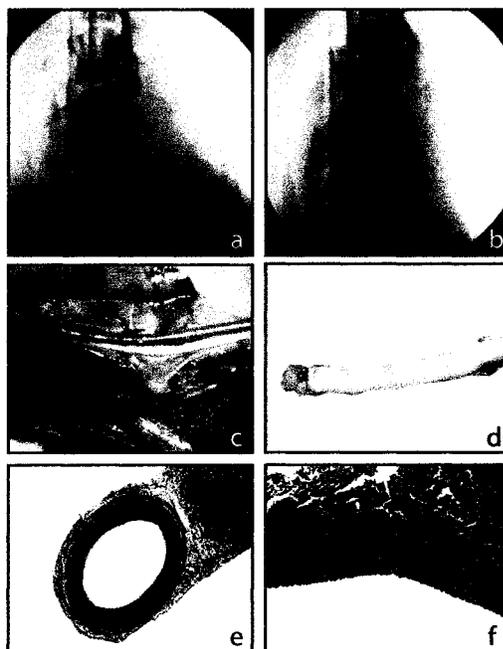


Figure 4. Poloxamer embolization of the left carotid artery. Left carotid arteriogram before embolization (a) and radiograph of poloxamer cast of the left carotid artery (b) immediately before sacrifice. Macroscopic photography immediately after sacrifice (c, d) and pathology (e, f) revealed no vascular injury.

High flow large venous structures (n = 3) could be occluded with large amounts of poloxamer injected at a fast rate. Partial occlusion of the cava was accompanied by clot formation in one case, the only visible clot associated with poloxamer use in the entire study. These injections led to the observation that escape of the polymer to the pulmonary bed led to poloxamer emboli that dissolved much more rapidly than direct pulmonary artery injections.

Poloxamer embolization in porcine arteries led to the same observations as in the canine model, with approximately 20 minute occlusions at all sites.

Complete and permanent arterial occlusions were produced by cyanoacrylate injected proximal to poloxamer in one hepatic artery, one lumbar artery, one circumflex vein, and one carotid artery. Cyanoacrylate could not penetrate beyond the poloxamer gel, nor infiltrate between the poloxamer cast and the vessel wall.

Catheters could be retrieved from femoral arteries without any compression or bleeding when poloxamer was used for femoral closure. However, after 15 to 32 minutes, the wound suddenly reopened in all cases, necessitating routine compression for hemostasis.

The injection of poloxamer did not cause any change in the coagulation time.

Results of routine hematology and biochemistry tests are summarized in Table 1.

Table 1. Results of routine hematology and biochemistry tests

Table 1
Results of routine hematology and biochemistry tests

| | | To | 1 hour | 24 hours | 1 week |
|----------------------|------------------|--------|--------|----------|--------|
| Creatinine | <i>Poloxamer</i> | 56.30 | 55.70 | 66.20 | 50.00 |
| | <i>Control</i> | 60.00 | 50.00 | 55.00 | 50.00 |
| Proteins | <i>Poloxamer</i> | 53.00 | 43.30 | 55.20 | 56.00 |
| | <i>Control</i> | 47.00 | 39.00 | 52.00 | |
| Triglycerides | <i>Poloxamer</i> | 0.33 | 0.50 | 1.53* | 0.66 |
| | <i>Control</i> | 0.25 | 0.26 | 0.30* | |
| Cholesterol | <i>Poloxamer</i> | 4.30 | 3.50 | 5.30 | 3.90 |
| | <i>Control</i> | 3.50 | 3.00 | 3.60 | |
| HDL | <i>Poloxamer</i> | 4.00 | 3.20 | 4.10 | 3.30 |
| | <i>Control</i> | 3.00 | 3.00 | 3.20 | |
| LDL | <i>Poloxamer</i> | 0.56 | 0.39 | 0.75 | 0.36 |
| | <i>Control</i> | 0.30 | 1.00 | 0.30 | |
| White cells | <i>Poloxamer</i> | 6.75 | 6.40 | 13.50 | 5.15 |
| | <i>Control</i> | 6.00 | 6.00 | 16.00 | |
| Platelets | <i>Poloxamer</i> | 290.00 | 271.00 | 294.00 | 215.00 |
| | <i>Control</i> | 200.00 | 180.00 | 300.00 | |
| Hematocrit | <i>Poloxamer</i> | 0.34 | 0.29 | 0.41 | 0.32 |
| | <i>Control</i> | 0.33 | 0.28 | 0.42 | |

* p=0.031 by a Independant-Samples T test

There were many physiological changes, found similarly in control dogs submitted to coil embolization, such as hemodilution immediately after the procedure, hemoconcentration and elevated white blood cell counts at 24 hours, a finding that we attribute to the stress of the procedures. Triglycerides were elevated at 24 hours, an abnormality not found in animals subjected to coil embolization (see table 1).

In 2 rabbits, the central auricular artery was catheterized and embolized with poloxamer 22 %. Occlusion times were approximately 90 minutes in both animals. Recanalization was directly witnessed by direct observation and magnification (Fig 5). Dissolution of

the material started at the level of arterial segments supplied by collateral branches, in a retrograde fashion. The lumen was recanalized along segmented channels at first. Once this process started, dissolution became accelerated and completed within another 30 minutes. After a period of transient ischemia, the ear appeared normal. Transient spasm, at the tip of the catheter, persisted longer than poloxamer occlusion on both sides. Rabbits were followed for 1 week, without any visible complication at the level of the ear or the central auricular artery.

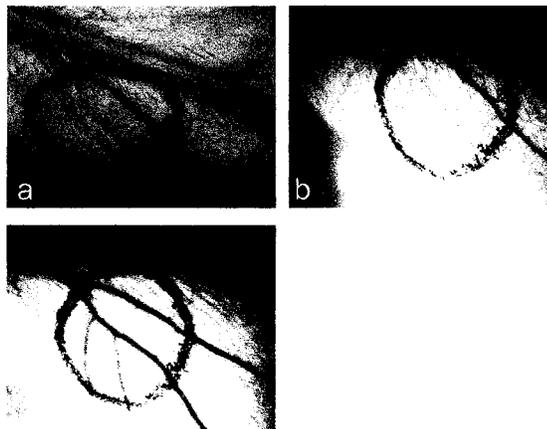


Figure 5. Recanalization of poloxamer occlusions. Macroscopic photography of auricular branches 10 (a), 60 (b) and 90 minutes (c) after poloxamer embolization of central auricular artery in the rabbit model. Poloxamer is dissolved by blood reaching the cast through collaterals (arrow).

4. Discussion

Embolization as a treatment option for vascular diseases is not new. The procedure often relies on blood flow directed embolization. In clinical practice, it is sometime desirable to shield a vascular bed from the embolic agent, or to redirect blood flow to the targeted site. Therefore, a short-term and reversible occlusive agent could find use in these procedures.

The attraction of inverse thermosensitive polymers is that they can be formulated as a liquid, which will gel at body temperature. Aqueous solutions of PEO-PPO-PEO block copolymers exhibit interesting temperature-induced aggregation as a result of the hydrophobic nature of the PPO block. At low temperature and concentration, PEO-PPO-PEO block copolymers exist in solution as dissolved monomers but self-assemble at higher concentrations and temperatures into micelles [8]. Polymer solutions of poloxamer 407 below 14% did not show gelation at any physiological temperature studied, while concentrations above 26% gel at temperatures that are too low for practical use.

Poloxamer injections led to consistent vascular occlusion at any site, provided the agent could be injected at a sufficient rate to fill the vascular lumen and gel before being carried away by blood flow. Poloxamer occlusions were always transient, and dissolution occurred 5 to 90 minutes after embolization. Poloxamer transient occlusion did not cause any visible vessel wall damage, immediately or at one week. End organs were unaffected by these short-term occlusions. Poloxamer embolization did not affect coagulation times, did not cause thromboembolic complications, nor vessel spasm.

No ischemic complication occurred after 90 minutes occlusions of the rabbit ears.

The time necessary for dissolution seemed to vary according to the completeness of filling and the status of the anatomical vascular bed. No significant difference was observed between arteries and veins, high flow or low flow, high pressure or low pressure, high resistance or low resistance systems. The hypothesis we proposed is that dissolution occurs according to the fraction of the total volume of poloxamer in contact with blood. According to this hypothesis, better filling of a vascular bed leads to a longer occlusion time. Sub-occlusions are rapidly recanalized. In high flow situations, the injection rate had to be very high. Too slow injections lead to ineffective embolization, distal embolization with fragmented poloxamer, incomplete occlusions, premature catheter blockage, and rapid dissolution. In that regard, a delivery system should be developed to cool the catheter. Such a system would prevent catheter blockage and provide better control of poloxamer delivery.

Poloxamer effectively and completely occluded arteries that were then subjected to glue embolization, without affecting cyanoacrylate polymerization. Results of these experiments show that this agent could be used to “protect” a territory during polymer, particulate, or chemo-embolizations.

A potential problem in short-term occlusions is thrombus formation. Poloxamers were found to be antithrombotic and inhibitors of platelet aggregation [9-11]. Indeed, in all occlusions that were performed with poloxamer 407, only one case of thrombus formation was found in a sub-occluded vena cava. The lack of poloxamer thrombogenicity may explain why their use as a femoral closure agent did not succeed: bleeding occurred as soon as femoral arteries recanalized, probably because platelet or fibrin thrombus could not seal the puncture tract.

Poloxamer transient occlusions were associated with transient elevation of triglycerides 24 hours after the procedure. These abnormalities in lipid metabolism have previously been described with systemic infusions of poloxamer [12].

The use of poloxamer as an adjunct tool for devascularization during surgery also deserve further thoughts. The lack of bleeding upon sectioning of arteries could lead to unnoticed vessel trauma and subsequent hemorrhages after wound closure. Other potential applications that deserve further studies are the use of poloxamer to deliver growth factors or gene therapy [7].

5. Conclusion

Poloxamer is a safe and effective temporary embolic agent that could be useful for protection of vessels during embolization procedures.

Acknowledgments

The authors wish to thank Guylaine Gevry for her assistance with artwork. This work was supported by Biosphere medical, Inc. and partially by Canadian Institutes of Health Research.

References

1. Nonionic Surfactants: polyoxyalkylene block copolymers, Vol. 60. Nace VM, Dekker M (editors), New York, 1996. 280 pp.
2. Cabana A, Abdellatif AK, Juhász J. Study of the gelation process of polyethylene oxide_a-polypropylene oxide_b-polyethylene oxide_a copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1997;190:307-312.
3. Maynard C, Swenson R, Paris JA, Martin JS, Hallstrom AP, Cerqueira MD, Weaver WD. Randomized, controlled trial of RheothRx (poloxamer 188) in

- patients with suspected acute myocardial infarction. RheothRx in Myocardial Infarction Study Group. *Am Heart J.* 1998 May;135(5 Pt 1):797-804.
4. O'Keefe JH, Grines CL, DeWood MA, Schaer GL, Browne K, Magorien RD, Kalbfleisch JM, Fletcher WO Jr, Bateman TM, Gibbons RJ. Poloxamer-188 as an adjunct to primary percutaneous transluminal coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1996 Oct 1;78(7):747-750.
 5. Orringer EP, Casella JF, Ataga KI, Koshy M, Adams-Graves P, Luchtman-Jones L, Wun T, Watanabe M, Shafer F, Kutlar A, Abboud M, Steinberg M, Adler B, Swerdlow P, Terregino C, Saccente S, Files B, Ballas S, Brown R, Wojtowicz-Praga S, Grindel JM. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2001 Nov 7;286(17):2099-2106.
 6. Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Dec 31;53(3):321-339. Review.
 7. Ron ES, Bromberg LE. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 May 4;31(3):197-221.
 8. Huang K, Lee BP, Ingram DR, Messersmith PB. Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups. *Biomacromolecules.* 2002;3:397-406.
 9. Carr ME Jr, Powers PL, Jones MR. Effects of poloxamer 188 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Thromb Haemost.* 1991 Nov 1;66(5):565-568.
 10. Armstrong JK, Meiselman HJ, Fisher TC. Inhibition of red blood cell-induced platelet aggregation in whole blood by a nonionic surfactant, poloxamer 188 (RheothRx injection). *Thromb Res.* 1995 Sep 15;79(5-6):437-450.
 11. Carr ME Jr, Carr SL, High AA. Effects of poloxamer 407 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Mar;7(2):109-113.

12. Blonder JM, Baird L, Fulfs JC, Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *Life Sci.* 1999;65(21):PL261-266.