UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DES « STENTS » CARDIOVASCULAIRES EN ALLIAGE SUPERÉLASTIQUE NICKEL-TITANE: STÉRILISATION, PROPRIÉTÉS DE SURFACE, CORROSION, ET THROMBOGÉNICITÉ

BENJAMIN THIERRY
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
SEPTEMBRE 1999

©Benjamin Thierry, 1999

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

Our file Notre référence

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.

0-612-48872-1

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTREÉAL

Ce mémoire intitulé:

ÉTUDE DES « STENTS » CARDIOVASCULAIRES EN ALLIAGE SUPERÉLASTIQUE NICKEL-TITANE: STÉRILISATION, PROPRIÉTÉS DE SURFACE, CORROSION, ET THROMBOGÉNICITÉ

présenté par : THIERRY Benjamin

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès Science Appliquées

a été dûment examiné par le jury d'examen constitué de:

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

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

M. SAVADOGO Oumarou, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. PELTON Alan, Ph.D., membre

Remerciements

Je voudrais en premier lieu remercier le Dr. L'Hocine Yahia pour m'avoir dirigé dans le cadre de ma maîtrise au sein des laboratoires du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux. Les relations intenses qu'il entretient tant dans le domaine de la recherche académique que dans le domaine industriel ont pour beaucoup contribué à la réalisation de cette étude. Je le remercie chaleureusement pour le respect et la confiance qu'il accorde à ses étudiants.

J'aimerais également remercier mon codirecteur de recherche, le Dr. Savadogo. Sa disponibilité et sa compétence ont été très profitables dans le cadre de ma maîtrise.

Deux années de collaboration intenses et je l'espère, fructueuses m'ont permis d'apprécier autant la compétence scientifique que les qualités humaines de Maryam Tabrizian. Sa disponibilité à toutes épreuves, sa patience, ses conseils (souvent ! ! !) pertinents et sa bonne humeur ont grandement participé au succès de cette étude. Mais plus important encore à mes yeux, ses qualités et son enthousiasme ont sans aucun doute durablement influencé ma vocation de chercheur...Merci.

L'aide précieuse et attentive de Christine Trépanier a également contribué pour beaucoup au succès de cette étude. Sa patience, ses conseils précieux, ainsi que les nombreuses corrections qu'elle a pu apporter à mes articles ont été autant de paramètres qui ont amélioré considérablement la qualité et la pertinence de mes recherches.

Merci par ailleurs aux membres de mon jury, le Dr. Pierre Savard, et le Dr. Alan Pelton. Les corrections pertinentes et les commentaires du Dr. Pelton se sont avérés extrêmement utiles. Par son intermédiaire, je tiens à remercier Cordis Corporation – Nitinol Devices &

Components pour leur soutien financier, technique et technologique tout au long de cette étude.

Au sein de l'Institut de Cardiologie de Montréal, j'adresse tout particulièrement mes chaleureux remerciements au Dr. Merhi. Je souhaiterais également remercier le Dr. Bilodeau pour les corrections pertinentes qu'il a pu apporter à mes articles. Un gros merci à Pierre Thai, pour sa gentillesse et sa disponibilité, à Jean François Théorêt, pour sa dextérité....et sa joie de vivre, et d'une manière plus générale à tous les membres du laboratoire de pathologie expérimentale. Merci également au Dr. Ahn.

Pour finir cette liste non exhaustive, j'aimerais remercier Gérard Guérin pour son aide précieuse, mais surtout, pour ses qualités humaines. Je souhaiterais également remercier Carole Massicotte, Marc Lacroix, Eric Boutin, Suzie Poulain. La stérilisation de nos échantillons a été gentiment effectuée par les hôpitaux Charles Lemoyne, St Eustache, et par le Centre de la santé de l'Estrie.

Indépendamment de toutes considérations scientifiques, mon épanouissement au sein des laboratoires du GRBB n'aurait pas été possible sans l'amitié (dans le désordre ! ! !) de Marc Allain, Nicolas Vilain, Nicolas Tran khanh, Yves Goussard, Sophie Lerouge, Karine Julien, Stéphane Moreau, Isabelle Catelas, David Savery, Fabrice Groccia, Anna Puigverts, etc. Leur bonne humeur, leur gentillesse, leur mauvais caractère (...), leur patience envers ma bonne humeur légendaire (...), leur compétence informatique (merci NicoVi ! ! !), etc., sont autant de qualités inestimables pour lesquelles je les remercie chaleureusement. D'une manière générale, je remercie l'ensemble des étudiants et du personnel de l'Institut de Génie Biomédical. Un gros merci également à Louise Clément et à Diane Giroux pour leur gentillesse et leur dévotion.

Montréal, le 31 août 1999

Résumé

Les propriétés mécaniques uniques de l'alliage quasiment équiatomique de nickel et de titane (NiTi ou nitinol) font de lui un matériau extrêmement intéressant dans de nombreux domaines d'activités, et plus particulièrement dans les sciences biomédicales. L'objectif de ce présent document est d'étudier, au travers du cas particulier des prothèses cardiovasculaires superelastiques (une des applications les plus exploitées de l'alliage) l'effet de traitements de surface, tels que l'electropolissage, et de différents processus de stérilisation sur les propriétés de surface, sur la résistance aux phénomènes de corrosion ainsi que sur l'haémocompatibilité de l'alliage.

Par l'intermédiaire de tests de polarisation cycliques, l'effet bénéfique du traitement de surface d'electropolissage a été mis en évidence. Les potentiels de rupture plus élevés et reproductibles, observés pour les échantillons electropolis en comparaison des échantillons polis mécaniquement, ont été positivement corrélés aux modifications de l'oxyde de surface engendrées par l'electropolissage caractérisées par Spectroscopie Auger (AES) et Microscopie à Force Atomique (AFM). L'oxyde de surface du NiTi electropoli est en effet plus homogène, et présente des concentrations surfaciques de nickel très faibles. Cette couche d'oxyde renforcée augmente ainsi la résistance à la corrosion de l'alliage. Les tests d'immersion par perte de masse effectués par absorption atomique ont confirmé l'effet positif de l'electropolissage. Dans le cadre de ces essais, les échantillons (des stents electropolis) de NiTi ont généré des taux de libération ionique légèrement supérieurs à ceux obtenus pour l'acier inoxydable. Cependant, cette différence s'est estompée au bout de quelques jours et les taux de libération n'étaient plus decelables par absorption atomique à partir de 17 jours d'immersion. Les taux observés pour le NiTi electropolis étaient plus faibles que ceux rapportés dans la littérature pour du NiTi ayant

été passivé chimiquement. De plus, les concentrations libérées lors des essais semblent bien en dessous des seuils considérés comme toxiques.

Indispensable avant toutes implantations cliniques, la stérilisation des dispositifs métalliques a fait l'objet dans le passé de nombreuses études expérimentales. Bien que contradictoires, ces études suggèrent, d'une manière générale, l'effet potentiel de la stérilisation sur les alliages métalliques. Les modifications de surface observées sur les échantillons de NiTi electropolis dans notre étude restent relativement faibles. Parmi les techniques de stérilisation testées, l'autoclave, la chaleur sèche et l'oxyde éthylène ont le plus sensiblement modifié la nature physico-chimique des oxydes de surface. Les oxydes plus épais (augmentations non significatives) et très hétérogènes (surtout pour l'autoclave) ainsi que les augmentations des quantités de nickel surfaciques suggèrent la diffusion du nickel au travers de l'oxyde défectif de titane lors de ces traitements. Les énergies de surface augmentées de près de 100% pour les techniques dites à base de plasma (Sterrad® et Plazlyte®) attestent également l'effet de ces techniques sur la surface du NiTi. En dépit de ces modifications, la résistance aux processus de corrosion de l'alliage stérilisé n'a pas été sensiblement modifiée. Toutefois, des potentiels de rupture faibles observés sur certains échantillons stérilisés par autoclave (2) et par acide péracétique (1) semblent indiquer un affaiblissement de la couche passive lors de ces techniques. D'une manière générale, l'electropolissage renforce la couche d'oxyde et semble ainsi inhiber l'effet des traitements de stérilisation, aussi bien sur les propriétés de surface que sur la résistance aux phénomènes de corrosion.

La thrombogénicité des alliages métalliques couramment utilisés dans la conception des stents demeure l'une de leurs principales limitations. Peu de donnés sont disponibles sur le caractère thrombogène du NiTi, et pour combler cette lacune, nous avons développé un modèle porcin de circulation extracorporelle. Par l'intermédiaire de celui-ci, l'effet des différentes techniques de stérilisation a été déterminé par mesure de l'absorption de protéines plasmatiques (fibrinogène) et des plaquettes sanguines sur la surface des stents.

Une tendance marquée mais non significative vers une plus faible thrombogénicité a été observée pour les stents stérilisés par oxyde d'éthylène et par acide péracétique. Cette tendance confirme les caractérisations de surface réalisées sur les disques de NiTi. En effet, les propriétés de surface influencent fortement la thrombogénicité des dispositifs métalliques. D'autre part, la thrombogénicité relative du NiTi par rapport à l'acier inoxydable a été déterminée en fonction du débit sanguin. Les stents en NiTi ont présenté de manière significative moins de thrombus fibrino-plaquettaire, la différence étant d'autant plus marquée pour des taux de cisaillement de 456 sec^{-1}. Les implications cliniques de ces résultats restent à déterminer, d'autant plus que de nombreuses limitations sont à prendre en compte dans les analyses de ceux-ci, mais ils semblent toutefois non-négligeables. Sur la base de cette étude, l'utilisation croissante des stents en NiTi semble justifiée, d'autant plus que leurs propriétés mécaniques sont parfaitement adaptées à la revascularisation des vaisseaux athérosclérosés.

Abstract

The uniques properties of nearly equi-atomic alloy of nickel and titanium (NiTi or Nitinol) account for its numerous applications, specially in the biomedical field. This work aimed to characterize the effects of various surface treatments such as electropolishing and of various sterilization processes on the surface properties and corrosion behavior of the alloy. The particular case of NiTi cardiovascular stents have been discussed through the study of the effects of sterilization processes on NiTi stents thrombogenicity.

Using cyclic polarization assays in Hank's physiological solution, the beneficial effect of electropolishing has been demonstrated. The breakdown potential observed on electropolished specimens were relatively high and reproducible in comparison to that of mechanically polished samples. The latter has been related to the surface modifications occuring during electropolishing. Indeed, as a surface treatments, electropolishing creates a more uniform titanium rich oxide layer with limited amount of superficial nickel. The surface characterization of electropolished samples has been achieved using Atomic Force Microscopy (AFM) and Auger Electron Spectroscopy (AES). Electropolishing has removed surface defects and thus improved the quality of the oxide layer. Passive dissolution processes was studied using immersion tests in Hank's physiological solution. The dissolution rates were measured by atomic absorption and confirmed the beneficial effect of electropolishing on the corrosion properties of the alloy. Even though NiTi initially released more nickel than 316L stainless steel, the dissolution rates for both materials were below the detection limits after 17 days of immersion. The nickel dissolution rate for NiTi was lower when compared with previously reported rate on NiTi

processed with various surface treatments such as passivation. Moreover, the nickel ionic release seemed to be far below the toxic level for both materials.

As the final step before implantation, sterilization has been reported to induce modifications on surface properties and corrosion behavior of metallic alloy. Our study revealed that sterilization were able to modify the surface properties of NiTi alloy. However, when compared with previously reported study, the observed modifications were relatively low in our study. The latter may be related to the protective effects of electropolishing as a surface treatments. Still, some modifications on the surface oxide layer, specialy for steam autoclave, dry heat and ethylene oxide techniques, suggested the diffusion of nickel through the defective titanium oxyde during sterilization processes. Conversely, the increase in surface energy for plasma treated specimens (Sterrad and Plazlyte) may have clinical consequences. Despite these surface modifications, the corrosion behavior of the alloy was not significantly modified by sterilization. Low breakdown potential values observed on some autoclaved (2) and peracetic acid (1) sterilized samples suggested the weakening of the protective film during such sterilization processes. Still, our results assessed the protective effect of the passive film enhanced by electropolishing.

To determine the effects of sterilization processses on the thrombogenicity of NiTi, a extracorporeal AV shunt model was used through labelling of platelets and fibrinogen in a porcine model. Despite some trends to lower thrombus formation for ethylene oxyde and peracetic acid sterilized specimens, no significant differences were observed. These trends were well corelated with surface characterization of sterilized samples. A more powerful protocol with more samples might permit to conclude on more significant results. The relative thrombogenicity of NiTi and stainless steel was also determined using the AV shunt model. Our study indicated that NiTi stents were significantly less thrombogenic than stainless steel stents of identical design. Stainless steel stents were also more shear stress dependent than NiTi.. Some limitations should be taken in

consideration, such as the lack of anti-platelet medications, etc. Still our results seem to justify the increasing use of NiTi as a materials of choice for cardiovascular stents.

Table des matières

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ VI

ABSTRACT IX

TABLE DES MATIÈRES XII

LISTE DES TABLES XV

LISTE DES FIGURES XVI

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XIX

CHAPITRE I - INTRODUCTION 1

CHAPITRE II - REVUE BLIBLIOGRAPHIQUE 5

II-1- L'ALLIAGE NICKEL-TITANE : HISTOIRE, STRUCTURES, PROPRIÉTÉS, SPÉCIFICITÉS 5

II-1-1- Le NiTi: les premiers pas... ..... *5*

II-1-2- Le NiTi : Structures et transformation martensitique *5*

II-1-3- Corrosion et biocompatibilité *12*

II-1-3-1- Corrosion des implants métalliques 12

II-1-3-2- Corrosion et biocompatibilité du NiTi 17

II-1-3-2-1- Propriétés de surface du NiTi 17

II-1-3-2-2- Corrosion du NiTi 19

II-1-3-2-3- Biocompatibilité du NiTi 21

II-2- L'ALLIAGE NiTi: APPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES, PROTHÈSES ENDOCORONAIRES ET PÉRIPHÉRIQUES 22

II-2-1- Athérosclérose *23*

II-2-2- De l'angioplastie aux stents cardiovasculaires *25*
II-2-3- Stents : caractéristiques principales *28*
II-2-4- Paramètres déterminant la thrombogénicité d'un stent *31*
II-2-3- Utilisation du NiTi dans la conception de stents cardiovasculaires *34*
II-3- STÉRILISATION DE L'ALLIAGE NITI 36

CHAPITRE III - PROCÉDURES EXPÉRIMENTALE 40

III-1- MATÉRIEL 40
III-2- MÉTHODES 42
III-2-1- Caractérisation de surface *42*
III-2-1-1- Energie de surface 42
III-2-1-2- Microscopie à Force Atomique (AFM) 43
III-2-1-3- Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 44
III-2-1-4- Spectroscopie Auger (AES) 45
III-2-2- Corrosion *46*
III-2-2-1- Polarisation cyclique 46
III-2-2-2- Absorption atomique 47
III-2-3- Thrombogénicité *47*

CHAPITRE IV - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 52

IV-1- ORGANISATION DES RÉSULTATS 52
IV-2- ATICLE 1: EFFETS DE DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE STÉRILISATION SUR LES PROPRIÉTÉS DE SURFACE DU NITI: 54
IV-3- ARTICLE 2: EFFETS DES TRAITEMENTS DE SURFACE ET DE LA STÉRILISATION SUR LA RÉSISTANCE À LA CORROSION DU NITI: 89
IV-4-ARTICLE 3: THROMBOGÉNICITÉ DE STENTS CARDIOVASCULAIRES EN NITI: 116

CHAPITRE V - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS 138

RECOMMANDATIONS 146

RÉFÉRENCES 148

Liste des tables

TABLE III-1: COMPOSITION DES DISQUES ET STENTS EN NITI 41

TABLE IV-1: DESCRIPTION OF SAMPLES AND STERILIZATION TECHNIQUES AND CONDITIONS 59

TABLE IV-2: SURFACE CHARACTERISTICS OF NITI SAMPLES AS MEASURED BY AES AS A FUNCTION OF STERILIZATION PROCESSES 65

TABLE IV-3: THE RELATIONSHIP BETWEEN SURFACE CHARACTERISTICS AND STERILIZATION PROCESSES AS OBSERVED BY AFM 67

TABLE IV-4: THE EFFECT OF STERILIZATION PROCESSES ON STATIC CONTACT ANGLE AND SURFACE ENERGY 73

TABLE IV-5-A: COMPARATIVE STATISTICAL ANALYSES OF STATIC CONTACT ANGLE WITH WATER (θ_{WATER}) .. 81

TABLE IV-5-B: COMPARATIVE STATISTICAL ANALYSES OF AVERAGE ROUGHNESS (R_A) 81

TABLE IV-6: COMPOSITION OF TESTED MATERIALS (WT%) 95

TABLE IV-7: BREAKDOWN POTENTIAL (E_B) AND REPASSIVATION POTENTIAL (E_P) FROM CYCLIC POLARIZATION ASSAYS IN HANK'S SOLUTION. 102

TABLE IV-8: CHARACTERISTICS OF STAINLESS STEEL AND NITINOL STENTS USED IN THE STUDY 121

Liste des figures

FIGURE II-1: HYSTÉRÉSIS LORS DE LA TRANSFORMATION MARTENSITIQUE 6

FIGURE II-2: SUPERELASTICITÉ DE L'ALLIAGE NITI 8

FIGURE II-3: COURBES DE CHARGEMENT/DÉCHARGEMENT ET APPLICATION EN ORTHODONTIE. 9

FIGURE II-4: EFFET MÉMOIRE SIMPLE SENS DE L'ALLIAGE NITI. 10

FIGURE II-5: DÉPLOIEMENT D'UN FILTRE POUR LA VEINE CAVE. 11

FIGURE II-6: SCHÉMA PRÉSENTANT LES ZONES DE SUPERELASTICITÉ ET D'EFFET MÉMOIRE DE FORME DU NITI EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'ÉTAT DE CONTRAINTE. 11

FIGURE II-7: FORMATION D'UN ATHÉROME. 23

FIGURE II-8: MODE D'ACTION DE L'ANGIOPLASTIE PAR BALLON 25

FIGURE II-9: PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN STENT. 26

FIGURE II-10: IMPLANTATION "TYPE" D'UN STENT DÉPLOYABLE PAR BALLON 26

FIGURE II-11: CASCADE DE COAGULATION IMPLIQUÉE DANS LA FORMATION D'UN THROMBUS INTRA-STENT 30

FIGURE II-12: PHOTOGRAPHIE DU STENT SYMPHONY (BOSTON SCIENTIFIC, USA) 34

FIGURE II-13: DÉPLOIEMENT D'UN STENT EN NITI 35

FIGURE III-1: PHOTOGRAPHIE DES DISQUES EN NITI ÉLECTROPOLIS 41

FIGURE III-2: PHOTOGRAPHIE D'UN STENT EN NITI REPRODUISANT LE DESIGN D'UN STENT PALMAZ (J&J, CORDIS CORPORATION, USA) 42

FIGURE III-3: PHOTOGRAPHIE D'UNE GOUTTELETTE DÉPOSÉE SUR LA SURFACE D'UN DISQUE EN NITI..... 43

FIGURE III-4: PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN AFM..... 44

FIGURE III-5: EMISSION D'ÉLECTRONS AUGER SOUS L'EFFET DU FAISCEAU D'ÉLECTRONS..... 45

FIGURE IV-1: TYPICAL AES SURVEY SPECTRA FOR ELECTROPOLISHED SAMPLES 63

FIGURE IV-2: TYPICAL DEPTH PROFILE FOR ELECTROPOLISHED SAMPLES..... 64

FIGURE IV-3: AFM IMAGES AND PROFILE ROUGHNESS AS A FUNCTION OF STERILIZATION PROCESSES 67

FIGURE IV-4: THE VARIATION OF OXIDE LAYER THICKNESS AND O/TI RATIO FOR PROCESSED SAMPLES BY VARIOUS STERILIZATION TECHNIQUES 78

FIGURE IV-5: SUPERFICIAL NICKEL CONCENTRATION AND TI/NI RATIO AS A FUNCTION OF STERILIZATION PROCESSES 79

FIGURE IV-6: CHANGES OF STATIC CONTACT ANGLE VERSUS STERILIZATION PROCESSES FOR NITI DISCS ... 80

FIGURE IV-7. TYPICAL AFM IMAGES OF MECHANICALLY POLISHED AND ELECTROPOLISHED NITI DISCS. ... 99

FIGURE IV-8. TYPICAL AES DEPTH PROFILE OF MECHANICALLY POLISHED NITI (MP), ELECTROPOLISHED NITI (EP NITI), ELECTROPOLISHED NITI AFTER IMMERSION IN HANK'S SOLUTION FOR 21 DAYS AT 38°C (IM. EP NITI), AND ELECTROPOLISHED STAINLESS STEEL. 100

FIGURE IV-9. CYCLIC POLARIZATION CURVES IN HANK'S SOLUTION OF ELECTROPOLISHED NITI DISCS IN COMPARISON TO THAT OF MECHANICALLY POLISHED NITI, STAINLESS STEEL (316L) AND TITANIUM ALLOY (TI6AL4V). 101

FIGURE IV-10. CYCLIC POLARIZATION CURVES IN HANK'S SOLUTION OF STERILIZED NITI DISCS IN COMPARISON TO THAT OF ELECTROPOLISHED NITI (EP NITI). 103

FIGURE IV-11. DETERMINATION OF NICKEL IONS RELEASE RATE FROM ELECTROPOLISHED NITI AND STAINLESS STEEL STENTS IN HANK'S SOLUTION AS A FUNCTION OF TIME OF IMMERSION AS MEASURED BY ATOMIC ABSORPTION 105

FIGURE IV-12. BREAKDOWN POTENTIAL FROM CYCLIC POLARIZATION ASSAYS IN HANK'S SOLUTION 106

FIGURE IV-13: NITI STENT MEASURING 30 MM IN LENGTH AND 3 MM IN DIAMETER REPRODUCING THE DESIGN OF THE PALMAZ® STENTS (J&J, CORDIS CORPORATION, USA) 121

FIGURE IV-14: SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE *EX VIVO* AV SHUNT MODEL. 123

FIGURE IV-15. DEPTH PROFILE FOR ELECTROPOLISHED NITI (LEFT) AND STAINLESS STEEL (RIGHT) STENTS 125

FIGURE IV-16. EFFECT OF STERILIZATION PROCESSES ON THE ^{125}I-FIBRINOGEN ADSORPTION AND ^{51}CR-PLATELET ADHESION ON ELECTROPOLISHED NITI STENTS AFTER 15 MIN OF PERFUSION. 126

FIGURE IV-17. COMPARISON BETWEEN THE AMOUNT OF PLATELETS ADHESION FOR EACH PERFUSION (N= 9) AT A WALL SHEAR RATE OF 456 SEC^{-1} FOR NITI STENTS AND STAINLESS STEEL STENTS (THE DOTTED LINE INDICATES THE MEAN VALUE) 127

FIGURE IV-18. EFFECT OF THE SHEAR RATE ON THE ADHESION OF ^{111}I-PLATELET ON NITI STENTS, STAINLESS STEEL STENTS AND CONTROL SILASTIC TUBES AFTER 15 MIN OF PERFUSION. 128

Liste des sigles et abréviations

ACT	Activated Clotting Time
AES	Auger Electron Spectroscopy
Af	Température de début de la transformation Austénitique
AFM	Atomic Force Microscopy
AMF	Alliage à mémoire de forme
As	Température de fin de la transformation Austénitique
DH	Dry Heat (chaleur sèche)
EO	Ethylene Oxide (Oxide d'ethylène)
Ep	Potentiel de protection ou de repassivation
Erest	Potentiel de repos (rest Potential)
FDA	Food and Drug Administration
Icorr	Densité de courrant de corrosion
Ipass	Courant de passivation
MEB	Microscope Electronique à Balayage
Mf	Température de fin de la transformation martensitique
Ms	Température de début de la transformation martensitique
NiTi	Alliage Nickel Titane
OCP	Open Circuit Potential
PLQ	Plaquette sanguine
PA	Peracetique Acid (acide péracétique)
PP	Plasma Plazlyte®
PS	Plasma Sterrad®
SA	Steam Autoclave (autoclave par vapeur)
SCE	Electrode de référence au calomel saturé
SEM	Scanning Electron Microscopy

SMA	Shape Memory Alloy
T	Température
Ti6Al4V	Alliage de titane, d'aluminium et de vanadium
UE	Union Uuropéenne
XPS	X-ray spectroscopie
γ	Energie de surface
γp	Energie de surface polaire
γd	Energie de surface dispersive
θ	Angle de Young
316 L	Nuance d'acier inxydable utilisée dans nos essais

CHAPITRE I - INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont, de nos jours, devenues la principale cause de mortalité dans les sociétés développées, notamment par le biais d'accidents vasculaires cérébraux ou de crises cardiaques. Le traitement préventif ou curatif de ces problèmes vasculaires fait appel souvent à l'implantation de prothèses endoluminales ("stents"), petits dispositifs métalliques de forme cylindrique dont l'objectif est d'opérer une "revascularisation" d'un vaisseau obstrué par un dépôt de matières grasses, l'athérome, et de fournir un support mécanique visant à prévenir la "refermeture" du vaisseau traité. Plus de 500 000 implantations sont réalisées chaque année aux USA, représentant ainsi des coûts considérables pour les systèmes de santé des pays ou ces maladies sévissent. Les premières implantations, réalisées au milieu des années 80 faisaient appel à des stents en acier inoxydable dont le déploiement requérait l'utilisation d'un ballonnet capable de déformer plastiquement les stents et par cette intermédiaire, de lui conférer sa forme finale. En dépit d'améliorations sensibles dans leur design, les mécanismes d'implantation de la plupart des stents actuels n'ont guere évolué. Les hautes pressions nécessaires au déploiement de ces dispositifs, la possibilité de retour élastique après déploiement ("springback"), leur manque de radiopacité, leur thrombogénicité, etc., ont conduit à d'intenses recherches pour identifier de nouveaux matériaux capables de palier à ces limitations. C'est ainsi que Cragg *et al.* et Dotter *et al.*, ont proposé en 1983 l'utilisation d'une nouvelle prothèse, construite à partir de l'alliage NiTi. Cet alliage quasiment équiatomique de nickel et de titane possède en effet la particularité d'exister dans deux phases cristallographiques différentes, ce qui lui confère des propriétés mécaniques uniques. La stabilité de ces phases est dictée par la température (et dans un degré moindre, l'état de contrainte du matériau) et le passage d'une phase à l'autre est assuré par le biais d'une transformation réversible, la transformation martensitique. En

plus des propriétés conférées par celle-ci, tels que la superelasticité, l'effet mémoire de forme, etc., que nous décrirons ultérieurement, l'alliage possède également une bonne biocompatibilité et présente une résistance à la corrosion similaire à celle des alliages métalliques couramment utilisés de nos jours(tel que l'acier inoxydable). Utilisant les propriétés thermoelastiques du NiTi, de nouvelles prothèses endoluminales ont donc été développé, avec pour caractéristique principale d'être "auto-expansibles". De nombreuses études, aussi bien expérimentales que cliniques, ont démontré les avantages du NiTi pour de telles prothèses. De nos jours, il est quasiment devenus le matériau de choix dans la conception de stents pour les procédures de revascularisation des vaisseaux périphériques, et est intensivement étudié pour la conception de stents coronaires.

Néanmoins, la biocompatibilité de l'alliage reste astreinte à sa résistance à la corrosion. La libération d'ions ou de particules métalliques dans l'organisme est susceptible de générer des réactions allergiques, toxiques, voires carcinogéniques. La nature chimique, le degré d'oxydation, la concentration, etc., modulent la nature et l'intensité de ces réactions. La résistance aux phénomènes de corrosion des biomatériaux métalliques est donc un paramètre clé dans la conception de dispositifs médicaux. Cette résistance est elle-même hautement dépendante de l'état de surface du matériau. En effet, la résistance à la corrosion d'un alliage passivable tel que le NiTi est assurée par la formation d'une couche protectrice d'oxyde de titane similaire à celle présente sur les alliages de titane, eux même très résistants à la corrosion et biocompatibles. Une précédente étude dans nos laboratoires a illustré l'effet positif de l'electropolissage comme traitement de surface (Trépanier *et al.*, 1998). La couche d'oxyde très homogène formée par ce traitement augmente en effet la résistance à la corrosion. Néanmoins, les mécanismes régissant cette amélioration sont encore conjecturaux et l'un des objectifs de notre présente étude était de caractériser les modifications de surface générées par l'électropolissage et de les relier avec la résistance à la corrosion de l'alliage. Pour cela, les modifications de surface engendrées par l'électropolissage ont été déterminées par Microscopie à Force Atomique (AFM) et Spectroscopie Auger (AES). La résistance à la corrosion a par la suite été

caractétisée par des tests de polarisation cyclique et des tests par "perte de masse" mesurée par absorption atomique.

Par ailleurs, la stérilisation des dispositifs médicaux est un impératif avant toute utilisation clinique. Néanmoins, la stérilisation peut modifier sensiblement les propriétés de surface des alliages métalliques, voir même certaines propriétés mécaniques. Les techniques couramment utilisées font appel à la chaleur (autoclave ou chaleur sèche), à des agents chimiques (oxyde d'éthylène, acide péracétique, peroxyde d'hydrogène, etc.), etc. De nouvelles techniques, commercialisées récemment, utilisent comme mode de stérilisation la combinaison d'une phase plasma et d'un agent chimique (plasma primaire et peroxyde d'hydrogène pour le système Sterrad®). Il existe un manque flagrant de données sur l'effet de ces techniques sur les alliages métalliques en général, et sur le NiTi en particulier. Notre objectif majeur était donc de caractériser l'effet de la stérilisation sur le NiTi électropoli, notamment sur ses propriétés de surface et sa résistance à la corrosion. Cette étude a été réalisé par mesure de l'angle de contact, par AFM, par AES (étude de surface) ainsi que par des tests de polarisation cyclique (résistance à la corrosion).

Nous avons également étudié l'effet des modifications induites par les techniques de stérilisation sur la thrombogénicité de stents en NiTi. En effet, l'une des problématiques majeures associées à l'utilisation des stents est la formation d'un thrombus "fibrino-plaquettaire" à l'intérieur de ceux-ci dans les heures ou les jours qui suivent l'implantation. Outre le risque d'occlusions rapides, plus ou mois annihilé (ou au moins réduit sous le seuil de 2% pour des artères de "grandes dimensions") par l'utilisation d'un régime anti-thrombotique, le développement d'un thrombus participe également au processus de "resténose" (ou refermeture partielle du vaisseau dans les mois suivant l'intervention). Le problème d'occlusion est crucial lorsque l'on considère des artères de petites dimensions (<3 mm) oú le risque est encore important. La formation du thrombus est intimement reliée à la surface de la prothèse, c'est à dire sa composition chimique et

ses propriétés telles que l'énergie de surface, la topographie, etc., mais aussi à sa géométrie et son design. La stérilisation, de par son effet potentiel sur la surface des implants, est ainsi susceptible de modifier la thrombogénicité du stent. Nous avons donc adapté et développé un modèle de circulation *ex vivo* pour déterminer précisément, par marquage radioactif des fibrinogènes et des plaquetes sanguines, la thrombogénicité relative de stents en NiTi en fonction du mode de stérilisation. Devant le manque de données sur ce point fondamental, nous avons également exploité ce modèle pour étudier la thrombogenicité du NiTi par rapport à celle de l'acier inoxydable, qui reste le matériau de référence pour ce type de prothèse. Pour cela, des stents en NiTi reproduisant précisément le design et la géométrie du stent commercial Palmaz (Cordis Corporation, USA) ont été spécialement manufacturés.

Après une étude bibliographique présentée dans le chapitre II, les matériaux, les techniques et les protocoles expérimentaux utilisés dans cette étude seront exposés dans le chapitre III. Nous avons choisi d'adopter la présentation dite "par article" pour la présentation de ces mêmes résultats et de la discussion associée. Les trois articles sous presse ou soumis constituent donc le corps de cet ouvrage et sont donc présentés dans le chapitre IV. Enfin, une discussion générale concluant sur la problématique développée dans la partie IV est présentée dans le chapitre V de la présente étude.

CHAPITRE II - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

II-1- L'alliage nickel-titane : Histoire, structures, propriétés, spécificités

II-1-1- Le NiTi: les premiers pas...

L'alliage de nickel et de titane, connue sous le nom de NiTi ou encore Nitinol (pour NIckel TItanium Naval Ordinance Laboratory), est un composé intermétallique principalement constitué de nickel (~55% massique) et de titane dont les propriétés thermoelastiques ont été découvertes en 1961 par l'équipe de W. J. Buehler. Initialement destiné à l'aéronautique, cet alliage a par la suite vu son champ d'activité s'étendre vers des domaines de hautes technologies tels que le génie biomédical. Il a fallu néanmoins attendre le début des années 80 pour voir l'apparition des premiers dispositifs médicaux exploitant les propriétés uniques du NiTi.

II-1-2- Le NiTi : Structures et transformation martensitique

L'alliage binaire de nickel et de titane (pour un pourcentage atomique de nickel variant de 50.6 a 51.0) possède la particularité d'exister dans deux structures cristallographiques différentes, dont la stabilité est fonction de la température. La forme stable aux températures élevées, l'austénite, se transforme en phase martensite lors d'un refroidissement en dessous des températures de transition Ces températures de transition sont caractérisés par un phénomène d'hystérésis présenté sur la figure II-1. En effet, 4 températures sont nécessaires pour définir la transformation: M_s ("martensite start", ou début de la transformation austénite vers martensite lorsque la température diminue), M_f

("martensite finish", ou fin de la transformation, c'est à dire disparition totale de l'austénite), A_s ("austenite start", ou début de la transformation inverse martensite vers austénite lorsque la température augmente), et A_f ("austenite finish", ou, disparition de la phase martensite). Ces températures sont régies par la composition chimique et l'histoire thermomécanique de l'alliage, mais des valeurs de 10 a 40 °C sont typiques pour l'hystérésis d'un tel alliage.

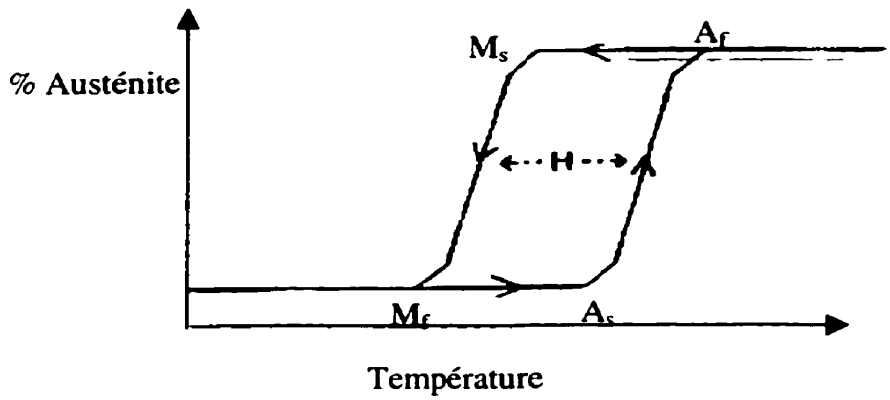


Figure II-1: Hystérésis lors de la transformation martensitique: Les températures régissant la transformation martensitique, A_s, A_f, M_s, et M_f sont définies par un phénomène d'hystérésis

Chacune de ces phases possède des propriétés différentes, et la transformation de phase réversible associée à ces deux structures confère à cet alliage des propriétés mécaniques uniques tels que l'effet mémoire de forme et la superelasticité. En effet, alors que la structure austénitique est unique, il existe 24 variantes possibles pour la phase martensite; ces variantes étant équiprobables, la transformation martensitique, dite par maclage, (i.e. austénite vers martensite) ne modifie pas la forme macroscopique du matériau. Cependant, sous l'effet d'une contrainte exercée sur le matériau, certaines variantes martensitiques vont être favorisées, ce qui entraîne une déformation macroscopique du matériau due aux mouvements des interfaces entre les variantes de martensite. Le retour à la phase austénite se traduit par un retour à la forme initiale, dans la mesure oú la

transformation macroscopique n'a pas excédé le seuil de déformation plastique. Le NiTi est généralement référé comme " superelastique " ou encore comme alliage à "mémoire de forme". Ces deux propriétés sont en fait les manifestations les plus évidentes de la transformation martensitique.

Superelasticité :

La superelasticité du NiTi se définit comme la capacité du matériau de se déformer sans déformation résiduelle, c'est à dire de manière réversible, jusqu'à 8% alors qu'un alliage métallique conventionnel se déforme irréversiblement (par déformation plastique) au-delà de 0.5 à 1% (env. 0.8% pour l'acier inoxydable). En effet, dans un intervalle de température adéquat au-dessus de la température de transition (A_f), la phase austénitique est capable de se transformer en martensite sous l'effet de contraintes. La phase martensite orientée ainsi crée et déformée n'étant pas stable à cette température, le relâchement des contraintes produit la transformation inverse, c'est à dire le retour à la phase austénite initiale, ce qui se traduit par le retour à la forme originale (Figure II-2). Néanmoins, si la déformation subie excède le seuil limite de superelasticité (env. 8% pour le NiTi), des déformations plastiques irréversibles sont crées.

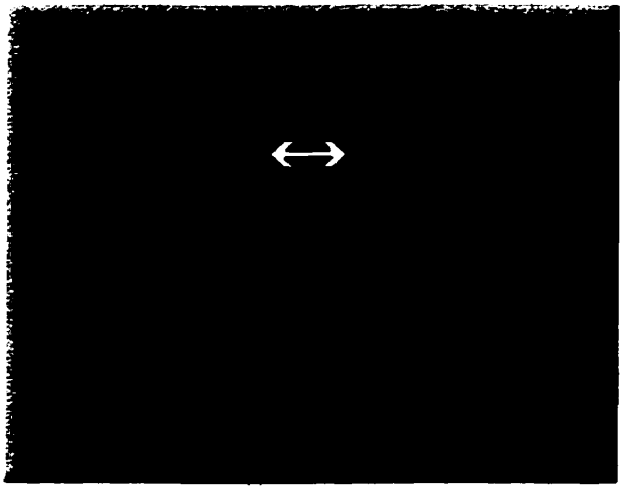


Figure II-2: Superelasticité de l'alliage NiTi

La principale limitation reliée à l'utilisation de la superelasticité réside dans l'intervalle de température relativement restreint à l'intérieur duquel cette propriété est optimale. Néanmoins, les températures rencontrées dans le corps humain sont parfaitement adaptées à l'usage de cet alliage. Ainsi, la première utilisation médicale du NiTi, les fils d'orthodontie, exploite ce phénomène. En raison de ses propriétés thermoélastiques, la courbe de chargement-déchargement du NiTi présente des plateaux qui sont caractéristiques de l'alliage considéré (Figure II-3). Un fil en NiTi exercera donc une force relativement constante - dépendante uniquement de la température, relativement stable dans la bouche du patient - sur les dents de ce dernier tout au long du traitement. Un fil semblable en acier inoxydable nécessite d'être remplacé régulièrement pour pallier la diminution de contrainte résultant du mouvement relatif des dents sous l'effet de cette même contrainte.

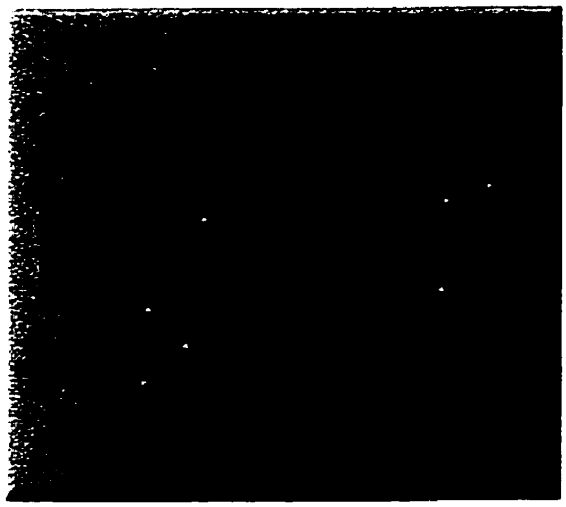


Figure II-3: Courbes de chargement/déchargement et application en orthodontie: La courbe contrainte/déformation de l'alliage présente des plateaux oú la contrainte est constante pour une large plage de déformation. Ceci permet la conception de fils d'orthodontie requérant moins d'interventions.

L'effet mémoire de forme :

L'effet mémoire de forme est la propriété que possède le NiTi martensitique de retrouver sa forme initiale après une déformation macroscopique par une augmentation de sa température. Ainsi que mentionné précédemment, le NiTi sous forme martensitique (c'est à dire la phase stable sous les températures de transition) peut se déformer "pseudo-plastiquement" facilement sous l'effet de contraintes. Cependant, sous l'effet de la chaleur, la transformation de la phase martensite en phase austénite induit le retour à la structure cristallographique initiale, ce qui s'accompagne d'un recouvrement de la forme de départ: c'est l'effet mémoire de forme "simple sens" illustré sur la figure II-4. On peut également, par des traitements thermomécaniques, éduquer le matériau et lui conférer la propriété de mémoire de forme "double sens", qui se définit comme la faculté du

matériau de posséder deux formes macroscopiquement différentes pour des températures au-dessus et au-dessous des températures de transition.

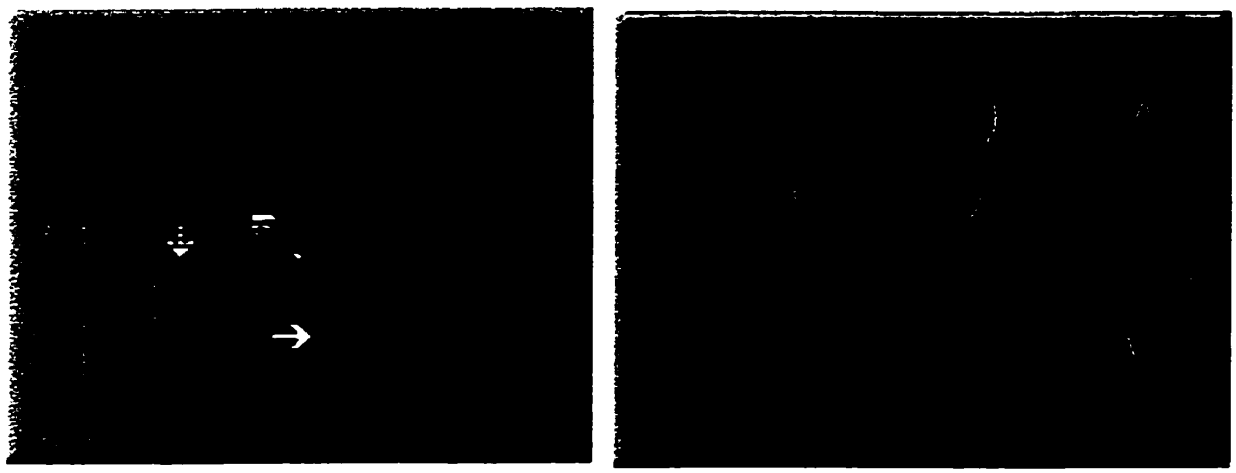


Figure II-4: Effet mémoire simple sens de l'alliage NiTi: Une barre sous la forme martensitique est déformée pseudo-plastiquement sous l'action d'une contrainte, puis retrouve sa forme originale sous l'effet de la transformation martensitique induite par une élévation de la température.

L'effet mémoire de forme offre de nombreuses possibilités dans la conception de dispositifs médicaux. Ainsi, le déploiement de filtres pour la veine cave est rendu possible par la transformation martensitique (Figure II-5). Brièvement, le dispositif est placé sur un cathéter dans la phase martensite. Pendant le positionnement du cathéter, le dispositif est maintenu dans sa forme martensitique par des injections de liquide froid dans le cathéter (ce qui est facultatif, mais permet de diminuer les contraintes exercés par le dispositif lors du positionnement). Le dispositif se réchauffe au contact du corps et, lorsque libéré du cathéter, il retrouve sa forme originale associée à la phase austénite, et est donc par la même parfaitement déployé dans la forme superelastique du NiTi. De même, le déploiement de prothèses vasculaires ("stents") en NiTi par effet mémoire est devenu courant dans la conception de telles prothèses. Une fois déployée, ces dispositifs

bénéficient de la superelasticité de l'alliage, ce qui dans le cas des stents est très avantageux comme nous le verrons ultérieurement.

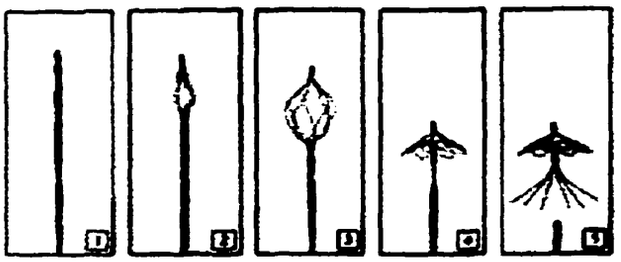


Figure II-5: Déploiement d'un filtre pour la veine cave: La transformation martensitique permet le déploiement du filtre à l'intérieur de la veine.

Le développement de dispositifs exploitant la thermoelasticité de l'alliage NiTi nécessite cependant une parfaite compréhension des mécanismes associés à la transformation martensitique. En effet, les propriétés décrites précédemment ne sont optimales que dans un intervalle de température relativement restreint. De plus, l'état de contrainte du matériau influence les zones de stabilités des deux phases cristallines (Figure II-6).

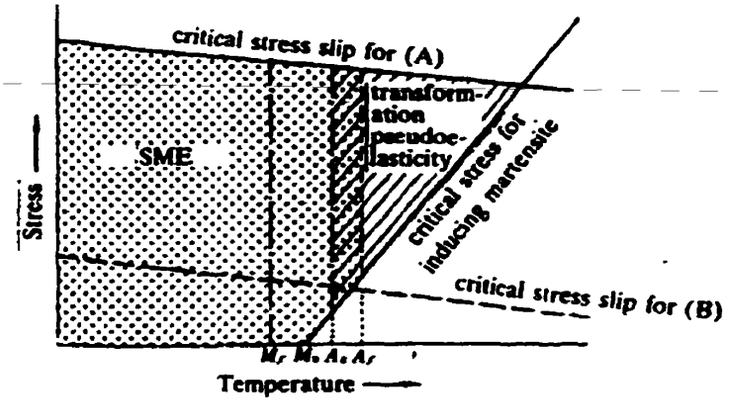


Figure II-6: Schéma présentant les zones de superelasticité et d'effet mémoire de forme du NiTi en fonction de la température et de l'état de contrainte.

Mais aussi...

La transformation thermoelastique martensitique confère également à l'alliage NiTi des propriétés amortissantes ("damping") particulièrement utiles en orthopédie. En effet, la dissipation d'énergie à l'interface austénite/martensite se traduit par une capacité d'amortissement mécanique très importante. L'énergie mécanique fournie à l'échantillon est ainsi dissipée sous forme thermique. L'exploitation de cette propriété permet, par exemple, de concevoir des prothèses de disque de la colonne vertébral.

Le NiTi sous sa forme martensitique possède également un module d'élasticité apparent faible. En effet, la relaxation des contraintes opérée lors du mouvement des interfaces entre les variantes de la martensite rend possible la déformation de l'alliage pour de faibles contraintes imposées. Ce module d'élasticité est ainsi beaucoup plus proche de celui des composantes biologiques tels que les os. Enfin, le NiTi présente également une bonne résistance à la fatigue, ainsi qu'une résistance à l'érosion supérieure à celle des alliages CoCrMo couramment utilisés dans des applications orthopédiques (Sekiguchi 1987).

II-1-3- Corrosion et biocompatibilité

II-1-3-1- Corrosion des implants métalliques

Les implants métalliques sont utilisés depuis de nombreuses années dans de multiples applications médicales, notamment dans les domaines orthopédiques et dentaires. Parmi les différents métaux utilisés, on retrouve essentiellement l'acier inoxydable, le titane pur ou allié, les alliages de chrome et de cobalt, le NiTi, etc. Outres les différentes propriétés mécaniques intrinsèques de ces matériaux, la résistance à la corrosion est le paramètre le plus important lors de la conception d'implants métalliques. En effet, la corrosion peut

altérer à la fois la fonctionnalité de l'implant, en modifiant son intégrité, mais également sa biocompatibilité. La biocompatibilité d'un implant métallique peut en effet se définir comme sa résistance aux différents processus de corrosion pouvant aboutir à une libération d'ions métalliques dans l'organisme. Elle est généralement évaluée par la réaction des tissus au contact de l'implant, ainsi que par l'observation de la quantité de métaux (sous forme ionique ou particulaire) dans les fluides physiologiques (sang, urine, etc.).

Différents modes de corrosion

Le corps humain constitue un milieu physiologique très agressif capable de provoquer des phénomènes de corrosion. Par définition, la corrosion d'un métal correspond à une réaction d'oxydation (i.e. sa dissolution avec formation d'oxyde selon l'équation $M+O \rightarrow M^{n2+} + R + ne^-$) et à une réduction cathodique (réduction de l'oxygène ou des protons). Dans la plupart des milieux physiologiques, les métaux se situent dans leur zone passive, dans laquelle ils sont relativement stables. Cependant, de par l'agressivité du milieu *in vivo* (chimique, mécanique, etc.), ils peuvent se trouver également dans des zones de potentiels apparents plus élevés et par conséquent, sur des taux de corrosion beaucoup plus importants.

Deux paramètres sont à considérer pour évaluer la corrosion d'un implant métallique. Tout d'abord, la thermodynamique est la " force motrice " de la corrosion. En fonction d'une échelle thermodynamique arbitraire, on peut classifier les différents métaux selon leur résistance théorique à la corrosion. Néanmoins, cette classification ne tient pas compte de l'autre facteur influençant la corrosion, c'est à dire le facteur cinétique. En effet, pour les alliages passivables, les taux de corrosion théoriques tels que prédits par les données thermodynamiques sont modifiés par des barrières physico-chimiques qui viennent les réduire. Ainsi dans le cas d'implants métalliques en NiTi, cette barrière est

naturellement assurée par la présence d'une couche d'oxyde protecteur (principalement d'oxyde de titane dans le cas du NiTi), dont l'efficacité dépend essentiellement de nombreux paramètres tels que la nature chimique de l'oxyde considéré (i.e. donc de celle de l'implant), de l'épaisseur, de l'homogénéité de l'oxyde, de la topographie, etc. De manière générale, la présence d'imperfection dans la couche d'oxyde sert de site d'initiation aux différents modes de corrosion.

Les traitements de surface visant à renforcer la couche d'oxyde, tels que l'électropolissage dans notre étude, sont couramment utilisés pour augmenter la résistance à la corrosion de tels implants. Notons également que plus la surface d'échange entre l'implant et le milieu environnant est importante, plus le problème de corrosion se pose. C'est particulièrement le cas avec des implants " poreux ", notamment utilisés en orthopédie pour favoriser l'ostéointégration. L'augmentation de la surface d'échange peut augmenter sensiblement la quantité de métaux libérés dans l'organisme. Toutefois, aucun cas clinique de cette nature n'a été rapporté jusqu'à présent à notre connaissance et le NiTi poreux testés a démontré une bonne biocomptibilité (Ayers *et al.*, 1999).

Quelle que soit la qualité et l'efficacité de la couche protectrice, les phénomènes de corrosion sont toutefois inévitables. L'objectif consiste donc à limiter ces phénomènes à des seuils suffisamment bas pour proscrire tout risque lors de l'utilisation clinique de ces implants métalliques. Les différents modes de corrosion associés à des implants métalliques sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Dissolution passive

La dissolution passive est un phénomène uniforme, qui se traduit par des taux de corrosion faibles, c'est à dire des quantités de " relargage " ionique réduites. Quelle que soit la nature de l'implant considéré, il sera "victime" de dissolution passive en présence

des fluides physiologiques du corps humain. Les faibles taux considérés (de l'ordre de 0.1-1 $\mu g/cm^2/jour$) ne semblent pas de nature à générer des réactions toxiques graves (Bianco *et al.*, 1996). Cependant, ce phénomène ne doit pas être ignoré car il permet la libération d'ions métalliques pouvant induire des concentrations suffisamment élevées pour provoquer des réactions "négatives" (si, par exemple, d'autres modes de corrosion se superposent) (Black *et al.*, 1996).

Corrosion par crevasses et piqûrations

Les modes de corrosion les plus couramment observés avec des implants métalliques sont la formation de " crevasses " de corrosion et la piqûration. Ces deux phénomènes sont des attaques localisées. Contrairement à la dissolution passive, les taux de corrosion, et donc de "relargage" ionique, générés par ces modes sont élevées. Des conditions localisées de contrainte élevée, de faible pH, etc., provoquent la rupture du film passif protecteur et par la même autorisent ces taux de corrosion élevés. La corrosion par " crevasse " est particulièrement problématique dans le domaine des implants orthopédiques. Du fait de la forme spécifique de certains implants, les conditions sont réunies pour un tel mode de corrosion. De nombreuses études ont rapporté des cas de prothèses ayant été corrodées par crevasse ou piqûration (Gilbert *et al*, 1993 ; Walczak *et al*, 1998) et ces observations coïncident souvent avec l'échec de l'implantation, nécessitant ainsi une révision de l'implant.

Corrosion galvanique, par érosion ou frottements

La mise en contact de métaux ou d'alliages de nature différente peut engendrer des phénomènes de corrosion galvanique, c'est à dire la formation de " réacteurs électrochimiques " entre les deux alliages en contact dans les fluides physiologiques. De

cette " pile " peut résulter des taux de corrosion très importants, mais elle peut également servir à prévenir la corrosion (par exemple le couple platine-titane). Dans le cas de prothèses cardiovasculaires, la mise en contact de stents différents pourrait théoriquement générer de tels phénomènes, même si Shin (1999) a récament observé de faibles courants galvaniques. De plus, par l'intermédiaire de frottements, les risques de corrosion sont accrus. En effet, au cours du mouvement respectif de deux matériaux en contact, des particules sont arrachées à ceux-ci (ou au plus fragile des deux), formant ainsi des débris d'usure qui seront ensuite dégradés ou non sous forme ionique. De plus, ces frottements peuvent détruire la couche d'oxyde protectrice, ce qui rend ainsi les implants beaucoup plus sensibles à la corrosion.

Cinétique d'élimination

Ainsi que nous venons de le voir, les ions libérés par les métaux peuvent se retrouver dans l'organisme à différents endroits. En effet, les ions métalliques possèdent la propriété de se "coller" de manière non spécifique ("*binding*") sur des protéines, ce qui a été mis en évidence sur de l'albumine, principale composante protéine (en nombre) du sang (Yang *et al*, 1994). Par ce vecteur, les ions peuvent ainsi être transportés vers différents organes. Dans le cas du rein, les ions seront éliminés par les urines, ce qui explique les concentrations métalliques sensiblement élevées observées chez certains patients ayant subie une implantation (généralement associés à des échecs de l'implantation). De nombreuses études ont été réalisées pour suivre l'évolution des concentrations ioniques dans les urines, aussi bien sur des modèles animaux (Brown *et al*, 1988) que sur des patients humains après différentes implantations de prothèses métalliques (Jacobs *et al*, 1998). Les ions libérés *in situ* peuvent également être transportés dans d'autres organes, où ils seront éventuellement métabolisés, conduisant ainsi à des accumulations parfois importantes (Pereira *et al*, 1998).

De plus, les cinétiques d'élimination de ces ions sont différentes selon la nature de l'élément considéré. Pour évaluer ces cinétiques, différentes études ont été réalisées, faisant appel à des injections de métaux sous forme de micro sphères et de sels métalliques, en plus des études réalisées à partir d'implants "classiques". Ces études, quoique de nature différente, tendent à montrer que certains ions métalliques tels que le nickel, le molybdène et le cobalt sont éliminés rapidement par l'organisme (de l'ordre de 24 à 48 h) par passage dans le sang puis élimination dans les urines (Brown *et al*, 1988 ; Merrit *et al*, 1996). Par contre, la cinétique d'élimination des ions chromes semble plus lente, et ils semblent pouvoir s'accumuler dans les tissus et les cellules sanguines (Brown *et al*, 1988; Merrit *et al*, 1996).

II-1-3-2- Corrosion et biocompatibilité du NiTi

De nombreuses études ont été réalisé ces dernières années pour évaluer la résistance à la corrosion et la biocompatibilité du NiTi. D'une manière générale, la biocompatibilité et la résistance à la corrosion de l'alliage peuvent être considérées comme bonnes, mais elles sont grandement dépendantes de l'état de surface du matériau et donc du traitement de surface. Nous allons donc, dans un premier temps, faire le point sur les caractéristiques de surface du NiTi, pour ensuite discuter de son comportement en corrosion et de sa biocompatibilité.

II-1-3-2-1- Propriétés de surface du NiTi

L'alliage NiTi est naturellement recouvert d'une couche d'oxyde protectrice d'épaisseur et de composition variable. Cette couche est principalement constituée d'oxyde de titane (TiO_2), mais la présence de faible quantité de nickel a été rapportée sous forme oxyde, métallique ou encore de composés intermétalliques (par exemple $NiTi_2$). La présence de

composés intermétalliques de type $NiTi_2$ a également été observé par de nombreux auteurs à la surface du NiTi (Filip *et al.*, 1994; Dutta *et al.*, 1993). Ces composés sont susceptibles de sévir de site d'initiation pour la corrosion par piqûration. La composition de la surface est régie par les enthalpies libres de formation des oxydes; La formation d'oxyde de titane étant thermodynamiquement favorisée en présence d'oxygène, on retrouve très peu de titane non oxydé à la surface du NiTi, alors que le nickel ne s'oxyde que partiellement. La composition chimique de la surface est dictée par le traitement de surface imposé au matériau (polissage mécanique, passivation chimique, electropolissage, etc.). En effet, les conditions de température, pression en oxygène, etc., influent sur les paramètres thermodynamiques régissants la composition de l'oxyde. Ainsi, Shabalovskaya *et al.* en 1996. ont rapporté une modification significative du ratio Ti/Ni superficiel après différents traitements tels que l'immersion dans l'eau bouillante (5.5% pour les échantillons polis mécaniquement contre plus de 20% pour les échantillons traités). De même, cette étude a montré que la stérilisation par un agent oxydant comme le H_2O_2 augmente la quantité de nickel à la surface de l'échantillon jusqu'à près de 30%. La diffusion du nickel au travers de la couche défective d'oxyde de titane a été observée et semble catalysée par la température (Espinós *et al.*, 1993). Dans une étude réalisée sur des stents en NiTi en, Trépanier *et al.* (1998) ont également mis en évidence l'effet de différents traitements de surface tels que l'electropolissage, la passivation chimique, traitement thermique, etc., sur les propriétés de surface et de corrosion de l'alliage. Ces traitements modifient sensiblement la composition chimique de la surface et l'épaisseur (et la composition) de la couche d'oxyde. La résistance de la couche d'oxyde (dont les propriétés mécaniques diffèrent de celles de l'alliage) aux déformations que le NiTi subit lors de l'implantation (par superelasticité ou effet mémoire) est un paramètre clé dans la résistance aux phénomènes de corrosion du NiTi. Kimura *et al.* (1987) ont toutefois observé qu'une couche d'oxyde formée thermiquement (900 °C, 10 min) resistait à ces déformations.

II-1-3-2-2- Corrosion du NiTi

Ainsi que mentionné précédemment, tous les implants métalliques sont, à des degrés variables, sensibles aux phénomènes de corrosion. De nombreux auteurs ont caractérisé la dissolution passive du NiTi par le biais de tests de " perte de masse " mesurée par absorption atomique. Ces tests ont indiqué une assez bonne résistance à la corrosion uniforme pour le NiTi, généralement du même ordre de grandeur que celle de l'acier inoxydable (Wataha *et al.*, 1999). Le taux de dissolution de nickel est relativement proportionnel à la quantité de nickel à la surface de l'implant, ce qui renforce encore l'importance du traitement de surface (Shabalovskaya *et al.*, 1996). Bass *et al.* (1993) ont rapporté des cas de conversion de patients devenus sensibles au nickel suite à l'implantation de fils orthodontiques. Des observations similaires ont été faites avec des implants orthopédiques en acier inoxydable (Cramers *et al.*, 1977). La dissolution sélective du nickel a été attribuée à l'instabilité des oxydes de nickel présent à la surface de l'alliage (Sarkar *et al.*, 1983). Ainsi, dans des tests réalisés par absorption atomique, Ryhanen *et al.* (1998) ont mis en évidence la dissolution du nickel lors de l'immersion, mais n'ont observé aucune quantité significative de titane. Sur la base de ces résultats, nous avons décidé de restreindre notre étude à la dissolution du nickel lors des tests d'immersion.

Beaucoup d'études sur le NiTi ont également été réalisées par l'intermédiaire de tests de polarisation cyclique dans des solutions physiologiques. Ces études indiquent généralement une bonne résistance à la corrosion localisée, c'est à dire la corrosion par piqûration. Ainsi, Wever *et al.* en 1998 ont observé une résistance à la corrosion localisée de l'ordre de 0.8 V/SCE pour du NiTi passivé, largement supérieure à celle observée pour l'acier inoxydable 316 L. Des résultats similaires ont été rapporté par Rondelli en 1996 même si cette étude a souligné les faiblesses du film passif lorsque détruit par des tests d'endommagement. Cependant, le processus de repassivation du NiTi necessite d'être étudié attentivement. D'une manière générale, l'état de surface modifie sensiblement la

résistance à la corrosion, ce qui rend la comparaison des différentes études difficile. La présence de défauts, de joints de grain, de contraintes surfaciques, etc., à la surface du matériau peut initier la formation de piqûres de corrosion. Nakayama *et al.* (1988, 1989) ont ainsi constaté une variabilité importante dans les potentiels de piqûration observés aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Ces variations dans leurs résultats ont été interprétées comme la conséquence de variation dans le film protecteur formé à la surface du matériau. Il semble donc que la reproductibilité des résultats, assurée par un traitement uniforme et reproductible de la surface, constitue un élément clé dans la préparation d'implants en NiTi résistants à la corrosion.

De nombreux traitements de surface visant à améliorer la résistance à la corrosion de l'alliage NiTi ont été étudiés ces dernières années. L'étude réalisée par Trépanier *et al.* en 1999 a mis en évidence l'effet positif de différents traitements (electropolissage, traitement thermique, passivation chimique) sur la résistance à la corrosion localisée de stents en NiTi. Ces résultats ont été reliés à l'amélioration de l'état de surface, c'est à dire une uniformisation de la couche d'oxyde formée lors du traitement de surface. De même, l'implantation ionique d'azote a récemment donné de très bons résultats, i.e. diminuée sensiblement le taux de dissolution de nickel pour des fils orthopédiques Jia *et al.* (1999) par la création de contraintes internes dues à la formation de précipités de TiN. De même, l'utilisation d'un traitement laser " excimer " (Villermaux *et al.*, 1997) et de recouvrement polymèriques (PTFE) effectué par plasma (Villermaux *et al.*, 1996) ont également amélioré le comportement en corrosion de l'alliage.

Cependant, outre l'état de surface et la composition de l'alliage, de nombreux autres paramètres influent sur les essais évaluant la corrosion *in vitro*. Ainsi, la nature du milieu physiologique (Hank's, NaCl 1%, milieu de culture cellulaire α-MEM...) servant d'électrolyte lors des tests a une influence non négligeable sur les résultats. De même, la nature de l'alliage considéré, i.e. sa structure martensitique ou austénitique, ainsi que son

histoire thermomécanique, ont également une influence sur sa résistance à la corrosion (Dutta *et al.*, 1993 ; Montero-Ocampo *et al.*, 1996).

Sur la base des remarques précédentes, il semble donc plus adéquat de déterminer la résistance à la corrosion dans des conditions bien spécifiques, c'est à dire pour une structure et un traitement de surface donnée dans des conditions précises. De plus, la prévision *in vitro* des phénomènes de corrosion susceptibles de se produire lors d'une implantation reste très aléatoire. D'une manière générale, les bons résultats obtenus pour ce type d'essais de corrosion sont toutefois confirmés par les essais *in vivo* indiquant une bonne biocompatibilité de l'alliage NiTi et ne rapportant que très peu de cas de corrosion.

II-1-3-2-3- Biocompatibilité du NiTi

De nombreuses études ont en effet évalué la biocompatibilité du NiTi, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Une bonne biocompatibilité *in vitro* de l'alliage a été rapporté récemment dans plusieurs de ces études. Ainsi, le relargage ionique de nickel observé lors de tests d'immersion est estimé être largement en dessous de celui considéré comme toxique (Jia *et al.*,1999). En effet, les tests *in vitro* réalisés ne rapportent aucune réaction cytotoxique, allergique ou génotoxique en présence de ces concentrations (Ryhänen *et al.*, 1998 ; Wever *et al.*, 1998). De même, Assad *et al.* ont démontré en 1998 l'innocuité d'un point de vue génotoxique de l'alliage. Toutefois, ainsi que nous l'avons mentionné, des concentrations surfaciques importantes en Ni peuvent être obtenues (près de 30%), par exemple suite à un traitement par H_2O_2, et générer des taux de dissolutions suffisamment importants pour altérer la prolifération cellulaire (Shabalovskaya *et al.*, 1996). Cette étude souligne l'importance du traitement de surface, qui permet d'augmenter significativement la résistance aux phénomènes de corrosion, et de ce fait, d'améliorer la biocompatibilité de l'alliage.

La publication de la thèse de Ryhänen en 1999 a fournit une étude quasi exhaustive de la biocompatibilité *in vivo*. Dans son étude, Ryhänen démontre une excellente biocompatibilité du NiTi, supérieure ou similaire à celle de l'acier inoxydable ou de l'alliage de titane Ti6Al4V. Un consensus semble se dégager pour une bonne biocompatibilité, même si les études de Berger-Gobet *et al.* en 1996 et celle de Takeshita *et al.* en 1997 rapportent des résultats mitigés sur des implantations réalisées dans des tibias de lapins et de rats. Néanmoins, peu de donnés récentes sont disponibles sur la biocompatibilité *in vivo* de l'alliage dans l'être humain. En dépit de multiples implantations réalisées avec succès en Chine ou en ancienne URSS (Yang *et al.*, 1987 ; Dai *et al.*, 1996), on dénombre assez peu d'études publiées sur ce sujet. Il existe néanmoins des dispositifs médicaux à base de NiTi acceptés par les organismes de santé en Europe, au Canada ou aux USA, et de ce fait couramment utilisés dans des applications cliniques. Les stents cardiovasculaires en NiTi, qui sont l'objet de cette présente étude, sont ainsi en voie de devenir les dispositifs les plus utilisés dans les procédures de revascularisation de vaisseaux périphériques. De nombreuses études cliniques ont évalué la réponse à court, moyen et long terme suite à de telles implantations et, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, rapporté de très bon résultats (Carter *et al.*, 1996; Cwikiel *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1996).

II-2- L'alliage NiTi: Applications cardiovasculaires, prothèses endocoronaires et périphériques

Du fait de ses propriétés décrites précédemment, l'alliage NiTi est exploité dans de nombreuses applications médicales. Dans le cadre de cette étude, nous nous contenterons de décrire en détail les prothèses endoluminales.

II-2-1- Athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité par l'intermédiaire de crises cardiaques ou d'accidents vasculaires cérébraux dans les sociétés dites "développés". Ces accidents sont le résultat de la formation d'un thrombus ou d'une embole bloquant la circulation sanguine au niveau du cœur ou du cerveau. La formation de tels thrombus est associée à une maladie chronique: l'athérosclérose. Elle se définie comme la formation de dépôt de nature lipidique au niveau de la paroi interne des vaisseaux sanguins, les athéromes (Figure II-7). Ces athéromes diminuent la lumière du vaisseau et par la même perturbent la circulation sanguine formant ainsi une sténose plus ou moins sévère. Dans le cas d'athéromes durcis par des dépôts de calcium, on parle alors d'athériosclérose. De nombreux facteurs tels que l'hypertension, le tabagisme, etc., augmentent le risque de développer de tels accidents cardiovasculaires. Hormis l'angine de poitrine (reliée à une trop faible alimentation sanguine au niveau du cœur), les signes avant coureurs sont rares et les conséquences souvent désastreuses.

Figure II-7: Formation d'un athérome: Le dépot de matières grasses à l'intérieur d'une artère (droite) obstrue celle-ci et réduit la lumière par rapport à une artère normale (gauche).

Angioplastie

La mise au point des techniques d'interventions par ballonnet en 1979 par Gruentzig *et al.* a constitué une avancée spectaculaire dans le traitement de la sténose. Cette percée a été rendue possible par la mise au point de techniques d'imagerie ultrason. Le principe de l'intervention est relativement simple, puisqu'il s'agit d'introduire un ballonnet gonflable au niveau de la lésion à traiter, puis une fois en place de procéder au gonflage du ballonnet (Figure II-8). En fonction des propriétés de la sténose, le gonflement du ballonnet peut provoquer une augmentation de la lumière (i.e. le diamètre intérieur utile) par écrasement de la plaque (dans le cas où celle-ci est relativement malléable), ou encore provoquer une fissuration de celle-ci dans le cas où elle est dure (présence de calcification). Enfin, le gonflement du ballonnet peut également générer une augmentation du diamètre du vaisseau traité.

Suite à ces modifications, la lumière du vaisseau est sensiblement augmentée, rétablissant ainsi la circulation sanguine. Néanmoins, dans un certain nombre de cas (30-40%), le phénomène de resténose ("refermeture" du vaisseau) peut survenir. Différents facteurs sont mis en cause dans l'apparition de la resténose, et l'importance de chacun n'est pas encore clairement élucidée. Le retour élastique, subséquent à la dilatation de l'artère et à ses propriétés viscoélastiques, ainsi que la croissance proliférative de l'intima (intimal hyperplasia) à partir des parois du vaisseau endommagées, provoquent la diminution de la lumière jusqu'au seuil limite de disfonctionnement (qui est défini comme la resténose), et sont autant de complications rencontrées lors des techniques d'angioplastie par ballonnet.

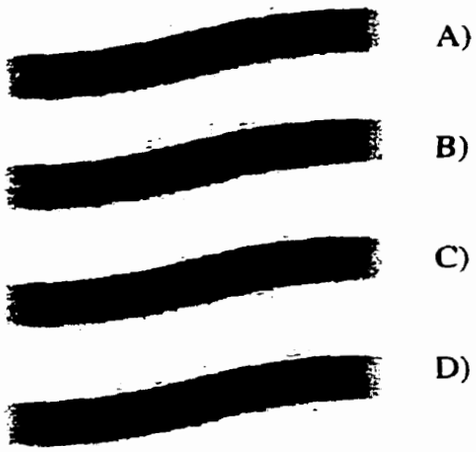


Figure II-8: Mode d'action de l'angioplastie par ballon: (A)-(B) Un ballon est inséré au niveau de la sténose, puis gonflé et déployé à une pression variable (~12-18 atm) (C) produisant ainsi la réouverture du vaisseau obstrué (D).

II-2-2- De l'angioplastie aux stents cardiovasculaires

L'apparition des prothèses endoluminales au milieu des des années 80 (même si le principe remonte au début des années70) a constitué une réelle révolution dans les techniques d'angioplastie. Leur rôle consiste principalement à fournir un support mécanique à l'artère dilatée comme l'illustre la figure II-9. Le stent exerce une force radiale et prévient de ce fait le retour élastique de l'artère et le "remodelling" (Benyar, 1997). L'implantation d'un stent permet de diminuer le taux de resténose de manière significative, diminuant ainsi le nombre de complications post-interventionnelles. Suite aux bons résultats rapportés par les études STRESS et BENESTENT (Serruys *et al.*, 1994), l'implantation de stents est devenue une composante majoritaire des procédures de revascularisation (~ 60% des cas). Ces implantations peuvent être réalisées via l'utilisation d'un cathéter gonflable classique (figure II-10), ou par d'autres techniques, en

fonction des propriétés intrinsèques du stent, ainsi que nous le verrons dans la partie consacrée aux stents auto-expansibles.

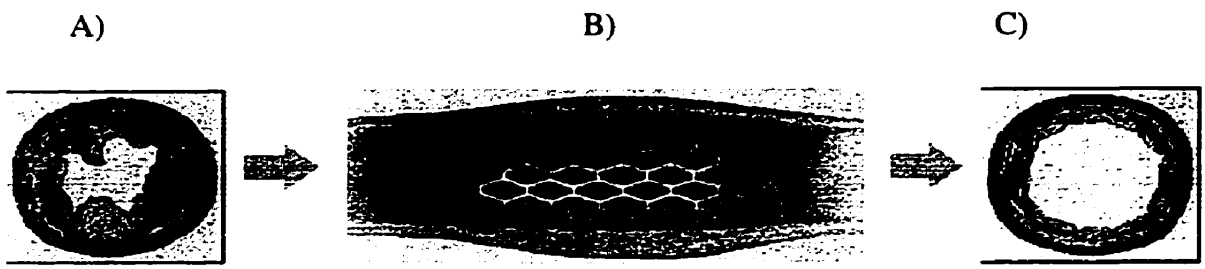


Figure II-9: Principe de fonctionnement d'un stent: La sténose est dilatée par ballon, puis le stent est mis en place et déployé (B), rétablissant ainsi un flux sanguin fonctionnel (C).

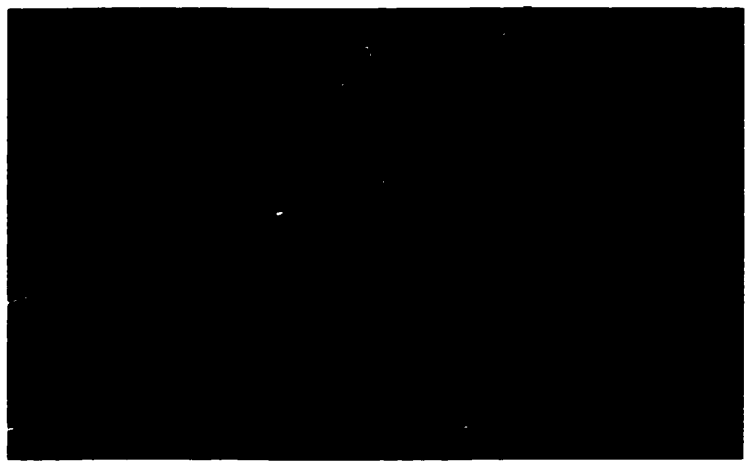


Figure II-10: Implantation "type" d'un stent déployable par ballon (ici le Palmaz- Schatz de J & J Cordis Corporation): Le stent (A) est monté sur un ballon (B), positionné au niveau de la sténose, puis déployé (C) et laissé de manière permanente dans l'artère (D).

Malgré les effets positifs décrits précédemment, l'utilisation de stents n'a pas supprimé le problème de la resténose. Elle est de plus associée à la formation de thrombus pouvant obstruer complètement ou non le vaisseau traité dans les heures/jours suivant l'implantation de la prothèse. Différents paramètres sont impliqués dans le développement de ces complications, mais d'une manière générale, la formation d'un thrombus reliée à la thrombogenicité du matériau utilisé ainsi que le traumatisme infligé au vaisseau lors de l'implantation constituent les éléments initiateurs de ces deux phénomènes. Le traumatisme est intimement relié au déploiement de la prothèse (qui dépend à la fois de la prothèse et du processus d'implantation) et à la pathologie du vaisseau considéré. D'autre part, la formation d'un thrombus est associée conjointement à la thrombogenicité du matériau utilisé, à la perturbation de l'écoulement sanguin et au traumatisme des parois vasculaires. La compréhension de ces phénomènes constitue un enjeu majeur dans l'élaboration de nouvelles générations de stent.

La thrombogenicité d'un stent est inhérente à sa composition métallique. En effet, la mise en contact d'un biomatériau avec le sang provoque en l'espace de quelques secondes l'adhésion de protéines suivie par celle de composantes cellulaires telles que les plaquettes, pouvant aboutir à la formation de caillots et par la même à l'occlusion du vaisseau. Dans le cadre d'un test international (BENESTENT trial), le taux de thrombose totale était de l'ordre de 3.5% (Serruys *et al.*, 1994). Pour prévenir de tels problèmes, l'insertion d'un stent doit à l'heure actuelle être accompagnée d'une thérapeutique anti-agrégeante et anti-plaquettaire pouvant elle-même générer des problèmes d'ordre hémorragiques, et qui a pour conséquence de prolonger le temps de séjour à l'hôpital des patients. Les procédures d'implantation ont considérablement évoluées, notamment grâce aux techniques d'imagerie associées aux déploiements optimaux des prothèses. De nombreuses améliorations sont toutefois encore souhaitables pour réduire les taux de resténose, aussi bien dans la conception du design que dans le choix des différents matériaux et des traitements de surfaces pré-implantation. Les différentes caractéristiques d'un stent sont décrites dans le paragraphe suivant.

II-2-3- Stents : caractéristiques principales

La biocompatibilité des différents matériaux

Les stents actuels sont fabriqués à partir de différents métaux, et sur la base des propriétés spécifiques de ceux-ci, différents designs sont utilisés. Les premiers stents commerciaux ont été conçus dans le milieu des années 80 (Wallstent). Depuis lors, des stents en acier inoxydable, en tantale et en NiTi ont été commercialisés ou sont en cours d'homologation. Chaque matériau possède, outre ses propriétés mécaniques propres, des degrés de biocompatibilité différents, puisqu'il est admis qu'aucun matériau n'est parfaitement biocompatible.

Les propriétés mécaniques et le design

Ainsi que nous l'avons vu, le rôle d'un stent est de fournir un support mécanique par l'application d'une force radiale sur les parois vasculaires pour prévenir le recul élastique et le "remodelling". De plus, le stent doit conserver une bonne flexibilité. Enfin, le stent doit être suffisamment radio-opaque pour être visible lors du positionnement. Tous ces paramètres dépendent de la nature du métal utilisé, de la quantité de métal dans le stent et du design de la prothèse.

En fonction de ces impératifs, deux grandes catégories de stents peuvent être distinguées : les stents tubulaires, déployés par ballonnet (Palmatz-schatz, Microstent, NIRstent, Multi-link, etc.) ou auto-expensibles (Wallstent), et les stents filamentaires (Gianturco-Roubin, Freedom, Wiktor-GX, Strecker, etc.). Il existe d'autres designs à partir desquels sont conçus des stents tels que le Bard xt, l'AVE Micro II, etc. Chaque design possède des avantages par rapport aux autres, et le choix d'un stent est bien souvent dépendant de la nature du problème à traiter (Bourachot *et al.*, 1997). Par exemple, les stents tubulaires

possèdent d'une manière générale une force radiale supérieure aux stents filamentaires, mais sont moins flexibles.

Thrombogénicité des stents

En contact avec un biomatériau, le système de coagulation, excessivement complexe par ailleurs, peut être activé, résultant par la même à la formation d'un caillot. Le principal vecteur de cette activation sont les plaquettes sanguines ainsi que mis en évidence dans une étude récente (Jeong, 1996). Les plaquettes sanguines sont des cellules d'une taille de l'ordre de quelques microns (3-4 µm) en forme de disque plus ou moins " plat ". Leur rôle premier est d'arrêter le saignement par la formation de caillots. Dans le cas d'un biomatériau en contact avec le sang, la première étape de la coagulation consiste en une adhésion quasi-instantanée de protéines à la surface du biomatériau. La nature et les propriétés de ces protéines conditionnent l'interaction entre les plaquettes et la surface des biomatériaux. La dénaturation des protéines telles que les fibrinogènes en fibrine est reliée à un transfert de charge électrique entre la surface du biomatériau et la protéine. Ce phénomène de dénaturation est un des éléments initiateurs de la cascade de coagulation (H. Nan *et al.*, 1998) (Figure II-11). Cependant, la nature exacte des interactions protéines-plaquettes/biomatériau n'est pas encore complètement comprise; cela est d'autant plus vrai dans le cas des biomatériaux métalliques, beaucoup moins étudiés que les polymères. La compréhension de ces phénomènes reste jusqu'à présent très empirique.

Même si ce phénomène se produit dans les premières heures/jours suivants l'implantation, la formation de thrombus fibrino-plaquettaire peut avoir des conséquences à moyen et long terme. Outre le risque d'occlusion rapide du vaisseau traité, le thrombus en formation initie le phénomène de resténose. Les preuves cliniques sont ténues et contreversées, mais les bons résultats obtenus à court (i.e. sur la formation de thrombus

associé à l'occlusion du vaisseau) et moyen terme (i.e. la prolifération néointimale) par les essais internationaux ISAR (Schomig *et al.*, 1996) et STARS (Leon *et al.*, 1998) semblent justifier cette théorie. Ces études ont testé avec succès des agents anti-plaquettaires destinés à prévenir la formation de thrombus. Dans ces études, la diminution du thrombus a non seulement réduit le taux de complications initiales, mais également la prolifération ultérieure. Une autre étude, menée par De Scheerder *et al.* en 1999, confirme également cette hypothèse. En effet, l'électropolissage de stents en acier inoxydable a été utilisé pour améliorer les propriétés de surface de ceux-ci. Cette amélioration a non seulement diminué la formation de thrombus dnas un modèle *ex vivo*, mais également la croissance néointimale dans un modèle *in vivo*. Les stents testés (electropolies ou non) ne différant que par leur surface, qui influe directement sur leur thrombogénicité, on peut escompter que la réduction observée de la thrombogénicité soit la cause de cette diminution de la prolifération cellulaire. Les mécanismes en jeu semblent, entre autre, reliés à la libération de facteurs de croissance par les plaquettes activées et bloquées dans le thrombus.

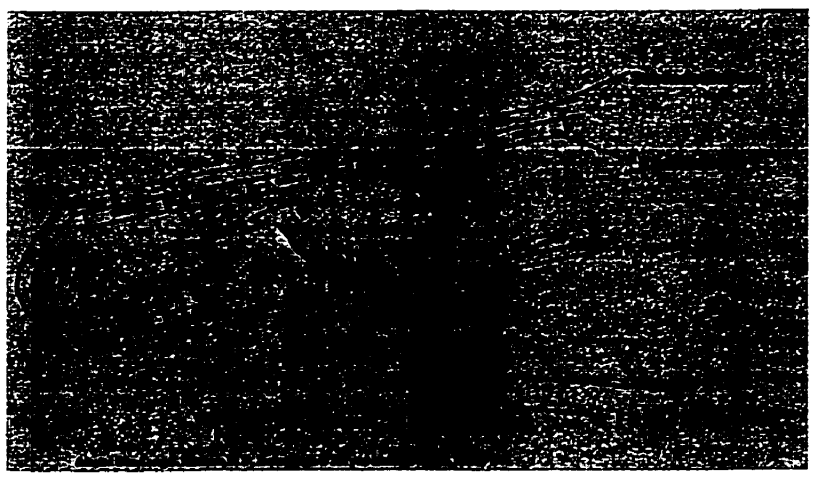


Figure II-11: Cascade de coagulation impliquée dans la formation d'un thrombus intra-stent: La formation d'un thrombus fibrino-plaquettaire est régie par l'interaction des plaquettes, des filaments de fibrine, et du facteur de vonWillebrand (vWF).

II-2-4- Paramètres déterminant la thrombogénicité d'un stent

De nombreux paramètres sont ainsi en jeu, à commencer par la nature même du biomatériau et les conditions rhéologiques. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence le rôle du taux de cisaillement ("shear rate") dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire. Ainsi, Mehri *et al.* (1997) ont montré que le taux de cisaillement ("shear rate") modifiait sensiblement la déposition de plaquettes aussi bien sur des parois vasculaires endommagées que sur des matériaux synthétiques tels que le Gore Tex. Il convient donc de prendre beaucoup de précautions pour contrôler le taux de cisaillement et les autres paramètres physiologiques lors d'études *ex vivo* et *in vivo*. Dans le cas des stents, la nature du métal (acier inoxydable, NiTi, tantale, etc.) influence la réaction plaquettaire et donc la " thrombogénicité " du stent. De plus, l'état de surface du biomatériau (i.e. la charge de surface, la topographie, les contaminants de surface, l'énergie de surface, etc.) modifient également sensiblement leur caractère thrombogéne.

La nature du métal

Comme nous l'avons vu, les différents stents sur le marché (ou en cours d'investigation) sont constitués soit d'acier inoxydable (de type 316 L, etc.), soit de tantale, soit de NiTi. Peu d'études ont été réalisées sur le caractère thrombogène relatif de chaque matériau. Néanmoins, il est plus ou moins admis que ces matériaux sont relativement peu thrombogènes. Pour évaluer leur thrombogénicité relative, il faut s'affranchir de tous les autres paramètres, tels que le design, le traitement de surface... Il faut de plus disposer d'un modèle reproductible, qui fait le plus souvent appel à un modèle animal, ce qui pose également de nombreuses questions sur la validité des résultats obtenus.

Une étude réalisée par Scott *et al.* (1995) a évalué la thrombogénicité respective du tantale et de l'acier inoxydable à partir de stent de même design sur un modèle animal

(babouin et porc). Cette étude a effectué un marquage radioactif des plaquettes (indium 111) et des fibrinogènes (iodine 125) et testé ces deux matériaux. Cette étude ne rapporte pas de différence significative, aussi bien dans l'adhésion plaquettaire que dans la quantité totale de fibrinogène adsorbée à la surface des stents. Aucune étude à ce jour ne compare la thrombogénicité du NiTi et de l'acier inoxydable ou du tantale. Les seuls essais réalisés sur ces matériaux ont toujours utilisé des designs différents ou des conditions statiques, ce qui ne permet pas de quantifier précisément la thrombogènicité *in vivo* du NiTi par rapport aux matériaux conventionnels. Ce point, pourtant très important, nécessite donc d'être étudié plus attentivement, ce qui est un des objectifs principaux de ce mémoire. Une étude réalisée par Sheth *et al.* (1996) avec des stents en acier inoxydable (Palmaz-Schatz) et en NiTi (de type " Slotted tube ". Advanced Coronary Technology) utilisant un modèle animal montre une réduction de la quantité de thrombus sur les stents en NiTi par rapport aux stents Palmaz-Schatz après 4 et 14 jours d'implantation. Néanmoins, les différents designs, ainsi que les différences intrinsèques dues aux propriétés mécaniques spécifiques du NiTi ne permettent pas d'extrapoler ces résultats, de plus semi quantitatifs, en terme de thrombogénicité relative de chaque alliage. Sutton *et al.* (1994) ont étudié la thrombogénicité de ces matériaux et n'ont pas observé de différence significative dans un modèle *in vitro* statique, ne reproduisant donc pas les conditions physiologiques. Les conséquences cliniques de telles études restent conjecturelles si l'on tient compte de leurs nombreuses limitations.

L'influence du design

Pour de multiples raisons, différents designs sont utilisés dans la conception de prothèses endocoronaires. De multiples études ont montré l'influence des designs sur la thrombogènicité d'un stent, même si les connaissances actuelles ne sont pas encore suffisamment développées pour optimiser définitivement ceux-ci. Ainsi, l'étude réalisée par Rogers *et al.* en 1995 met en évidence le rôle du design pour des stents en acier

inoxydable. Pour cela, deux designs différents possédant des caractéristiques communes (i.e. même masse, même % de métal en contact avec les tissus, etc.) sont comparés. Le taux de thrombose après 14 jours d'implantation indiquait des diminutions sensibles: de 42 % à 15% selon le design.

L'influence des traitements de surfaces

Comme pour touts biomatériaux métalliques, les stents sont traités avant implantation pour améliorer leur biocompatibilité. De nombreuses études *in vitro* ont montré l'influence de l'état de surface sur l'adhésion plaquettaire (Pérez-Luna, *et al.*, 1996; Nygren *et al.*, 1997). Cependant, il est difficile d'évaluer l'effet de ces différents traitements *in vivo* du fait des nombreux paramètres impliqués, ainsi que nous l'avons vu, dans la réponse plaquettaire. Toutefois, il est plus ou moins admis que des surfaces relativement homogènes, lisses et sans contamination soient de nature à réduire la réaction du système sanguin.

L'étude semi quantitative réalisée par Makkar *et al.* (1995) sur des stents en NiTi avec différents traitements de surface (polis, recouvert d'un polymère) montre clairement l'influence de l'état de surface sur la thrombogénicité (mesurée par le poids du thrombus obtenu après 20 min de circulation dans un modèle *ex-vivo*). Ainsi, une surface polie mécaniquement se révèle nettement moins thrombogénique qu'une surface non polie. Le poids du thrombus est alors similaire à celui obtenu avec un "*recouvrement*" polymèrique (PEO). Ces résultats sont en accord avec ceux de De Scheerder *et al.* (1998). Dans cette étude, l'utilisation d'un polissage électrochimique sur des stents en acier inoxydable a permis une diminution du taux de fibrinogène de l'ordre de 50 % (1.30 vs. 0.66 après 30 min de recirculation dans un modèle *ex vivo* porcin). Lors d'une étude semi quantitative, Hehrlein *et al.* (1995) ont comparé l'effet de ces différents paramètres sur des stents

Palmaz-Schatz et ont également conclu que l'état de la surface en terme de rugosité est déterminante.

II-2-3- Utilisation du NiTi dans la conception de stents cardiovasculaires

Initialement testé pour de tels dispositifs en 1983 par Dotter *et al.* et Cragg *et al.*, le NiTi est progressivement devenu un des matériaux de choix dans la fabrication de stents. En effet, les propriétés thermoelastiques de l'alliage ont permis le développement de nouvelles prothèses auto-expansibles tels que le SMART (Cordis NDC), le Vascucoil (Instent), le Cardiocoil (Medtronic), le Symphony (Boston Scientific, Cf. Figure II-12), etc. Le déploiement de ces stents est généralement réalisé selon le protocole suivant : les stents sont préalablement montés sur un cathéter dans une position contractée, et maintenus de la sorte par une enveloppe rétractable. Lorsque positionné au niveau de l'artère à traiter, la température du corps provoque la transformation martensitique du dispositif, c'est à dire la formation de la phase austénite mère. Le déploiement est alors assuré par le retrait de l'enveloppe qui permet ainsi l'expansion superelastique du stent jusqu'à sa forme deployée stable à la température du corps (Figure II-13).

Figure II-12: Photographie du stent Symphony (Boston Scientific, USA)

Les avantages d'un tel système de déploiement sont multiples. En effet, le caractère auto-expansible du stent annule ou diminue le besoin de déploiement par ballonnet nécessaire pour la plupart des stents en acier inoxydable. Ce type de déploiement utilise généralement de hautes pressions (pour assurer l'expansion optimale du stent), capables de créer des traumatismes au niveau des parois vasculaires, générant ainsi plus de complications post-opératoires (i.e. resténose). Il faut néanmoins noter que la présence de plaques calcifiées nécessite souvent un "post-déploiement", même pour des stents auto-expansibles.

Figure II-13: Déploiement d'un stent en NiTi: Au contact du corps, la température du stent augmente, ce qui produit ainsi la transformation martensitique. Le retrait de l'enveloppe protectrice libère le stent contracté et permet ainsi son expansion jusqu'au diamètre prédéfini.

Les propriétés thermoélastiques de l'alliage confèrent également à ces stents une expansion radiale plus uniforme, caractérisée par une moindre réduction (en longueur) du stent lors du déploiement ("shortening"). Cette expansion radiale est de plus exercée jusqu'à complète expansion, ce qui évite ainsi le retour élastique ("recoil") de la prothèse après son déploiement, mais nécessite toutefois un choix adéquat du diamètre du stent (pour ne pas endomager le vaisseau lors de l'expansion). Des examens cliniques ont ainsi démontré une augmentation progressive de la lumière (i.e. du diamètre du vaisseau) dans les jours suivant l'implantation ce qui peut avoir un effet positif sur l'efficacité du stent et la prévention de la resténose (Carter *et al.*, 1998; Roguin et al., 1999). Ce phénomène reste toutefois soumis à polémique. La superelasticité du stent déployé offre également de nombreux avantages, dont le plus important est sans doute une bonne flexibilité

indispensable au bon "fonctionnement" de la prothèse. Outre ces paramètres, de nombreuses études expérimentales et une expérience clinique de plus en plus importante justifient la "popularité" des stents en NiTi. Ainsi, une étude réalisée sur des chiens pendant deux ans a rapporté de très bons réultats. Après ce laps de temps, les stents étaient recouverts d'une fine couche de cellule endotheliale et aucune réaction inflammatoire n'a été détecté (Sutton *et al.*, 1988). De même, une étude comparative réalisée avec des stents en NiTi auto-expansibles et des stents en tantale expansibles par ballon a montré une croissance néointimale moindre avec le NiTi (Wakhloo *et al.*, 1994). Les stents en NiTi sont particulièrement utilisés dans le cadre des procédures périphériques. Dans ce domaine, on a rapporté de nombreux cas d'implantations cliniques et les résultats obtenus sont excellents en comparaison de stents "classiques" (Henry *et al.*, 1999). L'étude ESSEX, réalisée par van der Giessen *et al.* en 1997 avec le stent Radius de Boston Scientific, est la première étude importante réalisée pour des stents coronaires en NiTi et suggère leur avenir prometteur dans ce domaine.

II-3- Stérilisation de l'alliage NiTi

La stérilisation d'un dispositif médical est une nécessité avant toute utilisation clinique. L'objectif ultime de cette stérilisation est bien sûr de prévenir la transmission d'agents pathogènes, tout en préservant l'intégrité du dispositif. Ces deux principes sont parfois contradictoires, et un compromis est souvent nécessaire entre ces deux impératifs. L'efficacité de ces techniques est testée par l'intermédiaire d'essais standardisés utilisant des micro-organismes résistants à la stérilisation tels que les spores. Des standards internationaux sont en cours de dévelopement dans ces domaines, et sont disponibles auprès d'un organisme Américain: "Association for the advancement of medical instrumentation" (Arlington, USA). Les premiers modes de stérilisation connus, toujours utilisés de nos jours, sont ceux basés sur la chaleur, conjuguée ou non avec la présence

d'une phase vapeur (autoclave ou chaleur sèche). Le mécanisme d'action de la stérilisation par autoclave repose sur la dénaturation des protéines des bactéries par hydrolyse. La combinaison de la chaleur et de l'humidité est particulièrement efficace comme mode de stérilisation. Les températures utilisées sont de l'ordre de 120 à 130 °C (avec un taux d'humidité de 100% et des pressions de l'ordre de 30 psi pour une durée de l'ordre de quelques minutes) pour l'autoclave et jusqu'à 190 °C pour la chaleur sèche (durée variable de 1 à 3 heures). Néanmoins, elle présente des inconvénients majeurs, reliés notamment à la préservation de l'intégrité structurale des dispositifs. Ainsi, la chaleur est nocive pour les polymères et est susceptible de corroder les dispositifs métalliques, spcécialement dans le cas de l'autoclave. En effet, des taux importants d'humidité et des températures élevées constituent des conditions propices à la corrosion des alliages métalliques et des études ont rapporté depuis longtemps l'effet corrosif de l'autoclave sur des instruments de chirurgies (Custer *et al.*, 1964). De plus, d'importantes modifications des propriétés de surface (énergie de surface, oxyde de surface, etc.) ont été observées sur le titane et ses alliages. La stérilisation par autoclave est également susceptible de contaminer les surfaces par des composés inorganiques, dont l'effet néfaste a été mis en évidence *in vitro* par des tests cellulaires utilisant notamment des fibroblastes (Vezeau *et al.*, 1996; Stanford *et al.*, 1994).

La mise au point d'agents chimiques a permis le développement de techniques telles que la stérilisation par oxyde d'éthylène (EtO). Mise au point durant la seconde guerre mondiale par l'"Army's biological wafare laboratory", elle repose sur l'alkylation de fonctions chimiques spécifiques et permet la stérilisation des dispositifs thermosensibles. Néanmoins, l'oxyde d'éthylène laisse des résidus toxiques sur les dispositifs médicaux, et nécessite de ce fait des temps d'aération importants, et par conséquent des coûts de stérilisation élevés. Vezeau *et al.* (1996) ont décrits des effets négatifs de la stérilisation par EtO sur le titane similaire à ceux observés après stérilisation par autoclave et associés aux contaminants de surface. De plus, l'utilisation de l'oxyde d'éthylène est soumise à certaines restrictions reliées à des paramètres environnementaux.

Pour palier aux limitations de ces techniques "conventionnelles", de nouvelles techniques, particulièrement celles dites à "basses températures", sont étudiées et développées. Les radiations (Gamma par Cobalt-60, etc.) sont utilisées pour la stérilisation des dispositifs thermosensibles, mais sont limitées de par la complexité des installations nécessaires. La stérilisation par action simultanée d'une phase plasma et d'un agent chimique, comme c'est le cas dans les techniques Sterrad® (plasma et peroxyde d'hydrogène) et Plazlyte® (phase vapeur d'acide péracétique), présente d'intéressantes perspectives. Le mode d'action associé à ces techniques n'est pas parfaitement compris, et de nombreuses études sont encore nécessaires pour caractériser (et optimiser) l'effet relatif des phases chimiques et de la phase plasma. Le développement de stérilisateur par phase plasma uniquement est actuellement testé au sein de l'Ecole Polytechnique. Le système utilisant l'acide péracétique liquide comme agent de stérilisation commercialisé par Steris a reçue récemment l'approbation de la FDA pour son utilisation clinique. Néanmoins, peu d'études sont accessibles sur l'effet de ces nouvelles techniques sur les dispositifs médicaux.

Table II-2: Effets de différentes techniques de stérilisation sur les alliages métalliques

	Modifications de surface	Modifications internes
Autoclave	Corrosion (++); contamination	Propriétés mécaniques (-)
Chaleur sèche	Corrosion (+)	Propriétés mécaniques (-)
Oxyde d'éthylène	Corrosion (-); contamination	Négligeable
Radiation	Négligeable	Négligeable
Plasma associé à une ou plusieurs phase chimique	Augmente l'énergie de surface	Négligeable
Acide péracétique	Corrosion (+)	Négligeable

Le manque de connaissance relatif à la stérilisation des biomatériaux métalliques est encore plus flagrant dans le cas particulier du NiTi. Les effets de la stérilisation sur l'alliage ont été assez peu caractérisés. Il existe cependant quelques études réalisées sur

des fils d'orthodonties, mais celles-ci ne sont pas toujours concordantes. Une faible modification des propriétés mécaniques du NiTi a ainsi été rapporté par Silvaggio *et al.* (1997). Kapila *et al.* (1991 et 1992) ont également mis en évidence l'effet de la stérilisation par chaleur sèche conjuguée ou non avec des cycles d'utilisation cliniques sur les courbes de chargement/déchargement de l'alliage. Néanmoins, Crotty *et al.* (1996) n'ont pas observé de modifications mécaniques après stérilisation par autoclave ou par traitement avec une solution de glutaraldehyde 2% (Crotty et al., 1996). D'une manière générale, on peut penser que les techniques utilisant la chaleur peuvent influer sur les propriétés structurales de l'alliage (par exemple les températures de transitions), d'autant plus que la durée et les températures de traitement sont élevés. De plus, les températures utilisées dans les processus de stérilisation par la chaleur semblent suffisament élevées pour modifier les propriétés de surface. L'étude déjà mentionnée et réalisée par Shabalovskaya *et al.*, en 1996, est la seule connue à ce jour qui caractérise l'effet de la stérilisation sur la composition chimique de la surface du NiTi. Cette étude a montré que certains traitements (immersion dans l'eau bouillante, traitement par H_2O_2, etc.) modifiait très sensiblement le ratio Ti/Ni à la surface du matériau. Une corrélation a été observée entre la quantité de nickel à la surface de l'alliage et la toxicité de celui ci, ce qui souligne encore l'importance de la caractérisation de l'effet de la stérilisation sur de tels alliages.

CHAPITRE III - PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

III-1- Matériel

Pour des raisons pratiques (caractérisation des propriétés de surface plus facile) aussi bien qu'économiques (coût élevé d'un stent cardiovasculaire), la première partie de notre étude a été réalisée sur des disques (1.2 cm de diamètre, ~ 1 mm d'épaisseur, figure III-1) en NiTi fournis par Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components (NDC). La composition de ces échantillons est présentée dans la Table III-1. Ces échantillons ont été polis mécaniquement avec du papier #600 dans un premier temps, puis polis jusqu'au diamant 1 µm (fini miroir). Ces échantillons ainsi polis ont été par la suite électropolis par NDC selon les normes recommandées par l'ASTM. Le principe de l'électropolissage repose sur l'application d'un courant électrique entre une cathode et le matériau. Celui-ci est immergé dans un électrolyte dont la composition varie selon l'alliage considéré. L'avantage de cette technique est de ne pas modifier la structure cristallinne de l'alliage et de ne pas induire de contrainte interne. La qualité du procédé depend de nombreux paramètres, c'est à dire la composition de l'électrolyte, la température, le temps de traitement, la densité de courrant, et bien sur l'alliage considéré. Le procédé utilisé pour l'électropolissage de nos échantillons est confidentiel et ne peut être divulgué. Des échantillons en acier inoxydable (316 LVM) et un alliage de titane (Ti6Al4V) ont été également utilisés comme références après avoir été polis mécaniquement de manière identique aux disques en NiTi. Les conditions de stérilisation sont décrites dans l'article I. Dans le cadre de notre étude, nous avons étudié la stérilisation par autoclave, chaleur sèche (article I uniquement), oxyde d'éthylène, plasma Sterrad®, plasma Plazlyte® (article I uniquement) et acide péracétique liquide.

Figure III-1: Photographie des disques en NiTi électropolis

Table III-1: Composition des disques et stents en NiTi

	Ni	Ti	Al	V	Cr	C	Mb	Fe
NiTi	55.8	balance	-	-	-	-	-	-
316L	12-14	-	-	-	17-20	< 0.03	2-4	balance
Ti6Al 4V		balance	~6	~4	-	-	-	-

Pour évaluer la thrombogénicité de stents en NiTi et pouvoir la comparer avec celle de stents en acier inoxydable, des stents en NiTi reproduisant avec précision le design du Palmaz® (Cordis Corporation, USA) ont été spécialement fabriqués par Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components (Figure III-2). Ces stents ont été polis mécaniquement (sand-blasted) et électropolis similairement aux disques par NDC. Des stents Palmaz® en acier inoxydable ont été utilisés comme contrôles lors des essais *ex vivo*. Ces mêmes échantillons ont également été utilisés pour évaluer la dissolution passive lors des essais d'immersion (stents en NiTi et acier inoxydable électropolis)

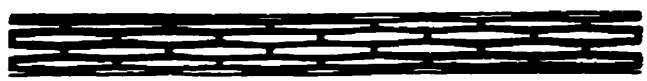


Figure III-2: Photographie d'un stent en NiTi reproduisant le design d'un stent Palmaz (J&J, Cordis Corporation, USA)

III-2- Méthodes

III-2-1- Caractérisation de surface

Ainsi que nous l'avons défini précédemment, la surface d'un biomatériau régit aussi bien sa résistance à la corrosion que sa biocompatibilité. Parmi la multitude d'instruments adaptés aux caractérisations des propriétés de surface, nous avons sélectionné la mesure de l'angle de contact, la Microscopie à Force Atomique (AFM), la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et la Spectroscopie Auger (AES).

III-2-1-1- Energie de surface

La mesure de l'angle de contact d'un liquide sur un substrat solide fournit des indications précieuses sur l'état énergétique de surface de ce substrat. Ces interactions sont dictées par la nature chimique de la surface, ainsi que par sa microtopographie. A partir de ces mesures effectuées avec des liquides possédant des propriétés différentes, il est possible d'estimer l'énergie de surface du matériau. Cette information est très utile pour prédire le comportement au niveau cellulaire des matériaux considérés. Pour cette étude, nous avons utilisé un système automatique, le "Vidéo Contact Angle System" (VCA 2500, Ast, Billerica, Ma) qui permet de mesurer les angles de contact avec une précision de l'ordre de ± 2°. Nous avons utilisé deux liquides différents, l'eau distillée et dé-ionisée et le

formamide. A partir de la mesure de l'angle de contact avec deux liquides de propriétés différentes, on peut, par différentes approximations, évaluer l'énergie de surface γ du matériau. Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode géométrique définie par l'équation suivante avec les deux liquides pré-citées et des gouttes d'un volume de 1 µL.

$$(1+\cos\theta i)\gamma_{lv} = 2\,[(\gamma_{sv}^{d}\,\gamma_{lv}^{d})^{1/2} + [(\gamma_{sv}^{P}\,\gamma_{lv}^{P})^{1/2}] \quad \text{(Méthode géométrique)}$$

(γ^P est l'énergie de surface polaire, γ^d est l'énergie de surface dispersive, θi est l'angle de contact entre le liquide et la surface du matériau)

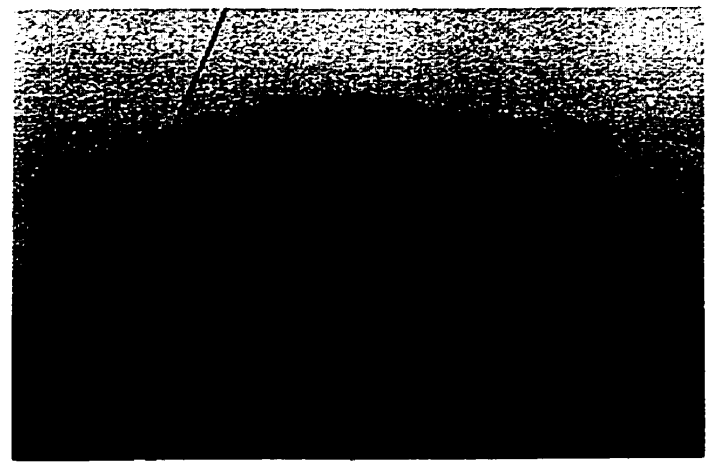


Figure III-3: Photographie d'une gouttelette déposée sur la surface d'un disque en NiTi. La mesure de l'angle de contact entre la surface et la goutte (angle de Young) avec différents liquides permet d'estimer l'énergie de surface du matériaux.

III-2-1-2- Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les techniques d'AFM ont été développées à partir de la Microscopie par effet Tunnel (STM) en 1986 par Binning, Quate et Gerber. Elles peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur la topographie de surface, mais aussi sur les propriétés telles que la dureté. Le principe général est de mesurer les forces répulsives entre la surface analysée et les atomes d'une pointe microscopique. Plusieurs modes de travail sont possibles, notamment le mode contact et le mode non contact. Nos analyses ont été opérées avec un AFM commercial de marque Topometrix (TMX 2010, Santa Clara, CA) en mode contact. La surface des échantillons a été scanné par une pointe en Si_3N_4 sur des zones de 50×50 µm et 10×10 µm.

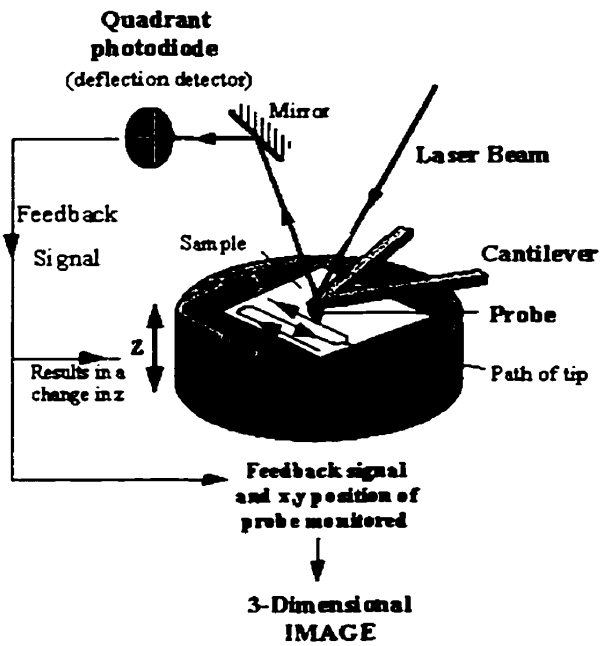


Figure III-4: Principe de fonctionnement d'un AFM: la surface est scannée par une pointe microscopique ("tip"). L'image est reconstituée à partir des informations obtenues par un faisceau laser réfléchi par un miroir.

III-2-1-3- Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les images ont été réalisées avec un MEB de type JSM 840 (JEOL, Japon). Les surfaces des stents testés lors des essais de perte de masse ont été observées après avoir été préalablement rincées.

III-2-1-4- Spectroscopie Auger (AES)

La spectroscopie Auger est couramment utilisée pour l'analyse chimique des surfaces conductrices. Elle permet de plus, lorsque couplée avec un système de décapage de surface par argon, d'obtenir des profils de concentrations des différents constituants présents dans le matériau analysé. Le principe de l'analyse repose sur l'émission par la surface d'électrons Auger et secondaire suite à un "bombardement" par un faisceau d'électrons. Du fait de la faible énergie de ces rayonnements, seuls ceux émis proches de la surface sont capables de "sortir" de l'échantillon, ce qui permet ainsi une étude vraiment précise de la surface (de l'ordre de quelques nm, Cf. Figure III-5).

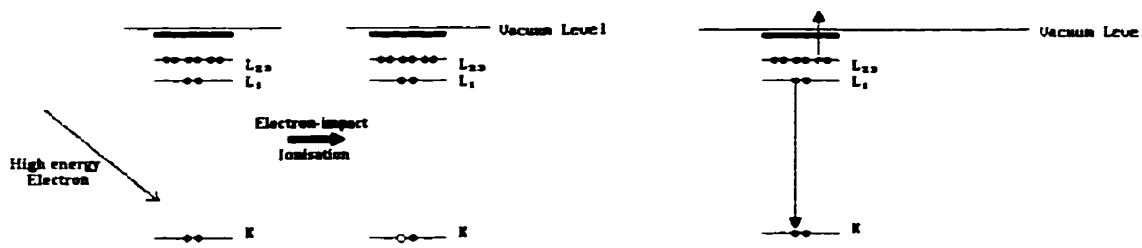


Figure III-5: Emission d'électrons Auger sous l'effet du faisceau d'électrons: Un faisceau énergétique excite le matériau et le retour à l'équilibre est opéré par émission d'un électron Auger caractéristique de l'élément chimique présent.

Nos analyses ont été conduites avec un AES de type JAMP 30 (JEOL, Japon). Trois spectres de survol dans le mode dérivatif avec une énergie de 10 keV ont été obtenus pour chaque échantillon testé. Les profils de concentrations ont été obtenus par bombardement à l'argon pour ces mêmes échantillons. L'épaisseur de la couche d'oxyde a été évaluée en

déterminant le temps de décapage nécessaire pour atteindre la demi-hauteur du pic d'oxygène.

III-2-2- Corrosion

III-2-2-1- Polarisation cyclique

Les tests de polarisation cyclique (ou voltamperomètrie cyclique) sont couramment utilisés dans l'évaluation de la résistance à la corrosion. En effet, les informations apportées sont multiples et caractérisent assez bien le comportement en corrosion, notamment en ce qui concerne la corrosion localisée. Le principe de ces essais consiste à imposer un potentiel variant de manière constante (0.17 mV/min dans notre cas) à partir de valeurs cathodiques (-250 mV vs potentiel en circuit ouvert mesuré après 30 min) jusqu'aux valeurs anodiques (1.4 V/SCE) pour ensuite effectuer un retour vers les valeurs cathodiques, effectuant ainsi un cycle. Ces essais ont été conduits dans une cellule électrochimique à trois électrodes classique, composée d'une grille de platine comme électrode de contrôle et d'une électrode standard au calomel saturé pour référence. L'électrode de travail était constituée de disques du matériau testé, montés sur un fil de cuivre par le biais d'une colle conductrice à l'époxy d'argent. Seule la partie traitée de l'échantillon était exposée à l'électrolyte lors de ces essais. Pour cela, les surfaces non traitées étaient enduites d'une laque protectrice isolante afin de ne pas fausser nos résultats. Les essais ont été conduits avec un potentiostat (EG&G Princeton Applied Research, model 273) dans une solution physiologique de Hank's maintenue à température constante (37 ± 1 °C) dont la composition est donnée dans l'article II.

Sur la base des essais de polarisation, les densités de courant des échantillons de NiTi, stérilisés ou non, ont été determinées par extrapolation des pentes de Tafel. A partir de la densité de courrant, les taux de corrosion peuvent être directement calculés tel que décrit dans la norme ASTM-G102-89 ("Calculation of corrosion rates and related information

from electrochemical measurements"). Même si cette méthode reste imprécise, elle permet toutefois d'évaluer de manière relative les taux de corrosion théoriques en terme de perte de masse (MR) par unité de surface et unité de temps.

$$MR = k_2\, i_{cor}\, EW$$

(k_2= 0.8953 g/Ad, unité SI, EW est le poids équivalent égale à 17.76 (sans dimension) pour le NiTi)

III-2-2-2- Absorption atomique

Pour évaluer la dissolution passive, nous avons réalisé des tests d'immersion dans une solution physiologique (Hank's). Pour cela, des stents en NiTi et en acier inoxydable ont été immergés dans 40 mL de solution, maintenue à température ambiante (38 °C) et agitée de manière continue. Après différents laps de temps (t= 1, 3, 9 et 17 jours), les solutions de Hank's étaient prélevées et analysées par absorption atomique (Perkin-Elmer, USA) pour déterminer la concentration en ion nickel et chrome, et remplacées par 40 mL de solution de Hank's. La résolution obtenue par cette technique était de 0.5 µg/L pour le nickel et de 0.2 µg/L pour le chrome.Les échantillons immergés ont été analysés après 21 jours par le biais de microscopie à balayage et de spectroscopie Auger pour déceler d'éventuelles traces de corrosion ou d'éventuelles modifications chimiques de la surface.

III-2-3- Thrombogénicité

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la thrombogénicité des matériaux métalliques utilisés dans la conception de stents constitue l'un des problèmes majeurs reliés à leur utilisation clinique. Nous avons repris et développé un modèle de circulation extracorporel mis au point à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Ce modèle permet d'évaluer la thrombogénicité par marquage radioactif des plaquettes sanguines et des

fibrinogènes. Sur la base de ce protocole, une évaluation industrielle respectant les normes "GLP" (Good Laboratory Practice) a été réalisée.

La première étape de ces essais consiste à réaliser un circuit extracorporel entre la veine fémorale et l'artère fémorale par le biais d'une tubulure en matériaux plastiques. Pour cela, la veine et l'artère sont dégagées et canulées avec un introducteur 8F (Cordis, USA) (Figure III-6,7). Simultanément, un échantillon de sang est prélevé pour réaliser le marquage plaquettaire. Celui-ci est réalisé par l'intermédiaire de centrifugations successives qui permettent d'isoler les plaquettes des autres constituants du sang (Figure III-8). Celles-ci sont ensuite incubées avec un marqueur radioactif (Chrome-51, Merck Frosst Canada Inc., Canada) puis resuspendues dans le plasma résultant de la centrifugation initiale. Les plaquettes ainsi marquées sont ré-injectées à l'animal environ une heure avant le début de l'expérience. De même, on injecte ~10 Ci de fibrinogène marqués à l'iode 125 (Amersham International plc, England).

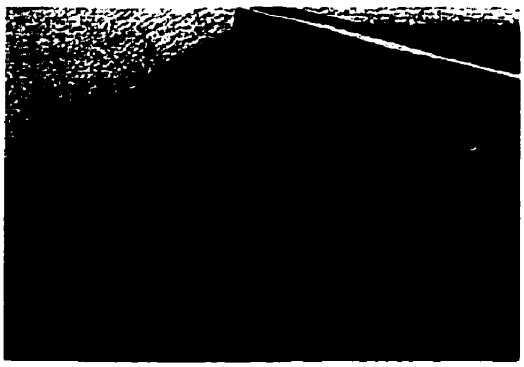


Figure III-6: L'artère fémorale est dénudée.

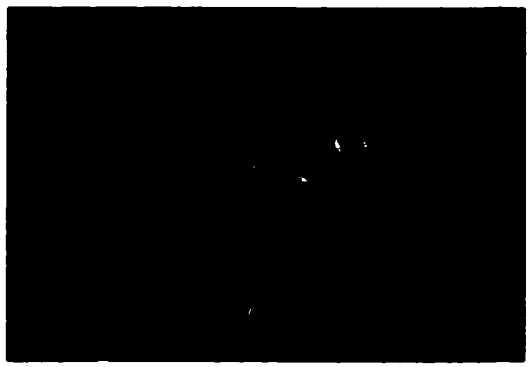


Figure III-7. L'artère fémorale est canulée pour établir la circulation extracorporelle.

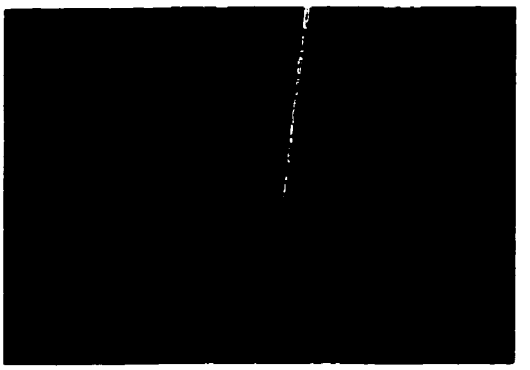


Figure III-8: Le sang prélevé est centrifugé pour obtenir un plasma riche en plaquettes

.

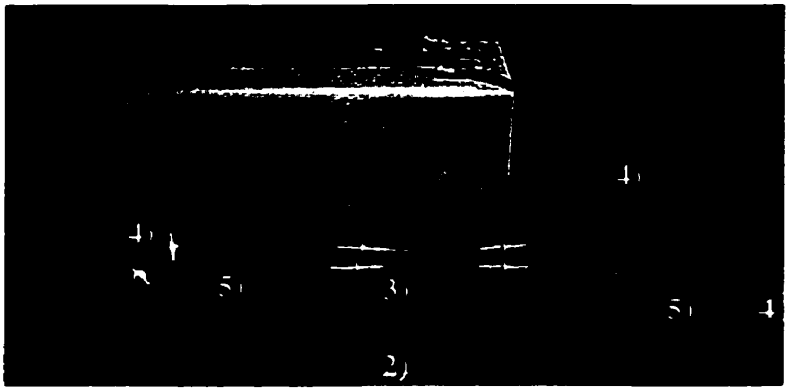


Figure III-9: Photographie du circuit extracorporel 1) Pompe, 2) Chambre de perfusion en Plexiglass, 3) Tubulure en Silastic® (Dow Corning, taille 0.125 inch DI × 0.250 inch DE), 4) Tubulure en Silicone (Fisher Scientific, DI 1/8, Epaisseur 1/16), 5) Tubulure en Silicone (Tygon, DI 3/32, Epaisseur 1/32)

Le circuit extracorporel est présenté sur la figure III-9. Lors de la perfusion, le débit est contrôlé par une pompe calibrée préalablement à chaque journée d'expérience. La température dans la chambre de perfusion est contrôlée par un bain-marie et maintenue à 37 ± 1 °C lors des perfusions. Avant le début de chaque perfusion, les stents à tester sont insérés dans des tubes en Silastic par l'intermédiaire de fils chirurgicaux et d'un passe-fil métallique (Figure III-10). Un ballon semi-compliant d'angioplastie conventionnel est ensuite placé à l'intérieur des stents, et gonflé à une pression de 12 atm pour un temps total de 18 sec (Figure III-11). Une fois le système mis en place, le temps de coagulation d'un échantillon de sang ("Activated Clotting Time", ACT) est contrôlé et maintenu à

une valeur de 200 ± 25 sec. Lorsque cette valeur est atteinte, une perfusion de 15 minutes commence (Figure III-13). Au terme de celle-ci, le système est rincé par circulation de saline pendant 15 sec (pour enlever les éléments biologiques non-fixés sur les stents). Les tubes contenant les stents sont alors prélevés (Figure III-14), et préparés pour le comptage réalisé avec un compteur gamma Minaxi 5000 (Packard Instruments Co.). Le taux de radioactivité ainsi mesuré est converti en terme d'adhésion plaquettaire et d'adsorption de fibrinogène selon la méthodologie détaillée par Merhi *et al.* en 1996.

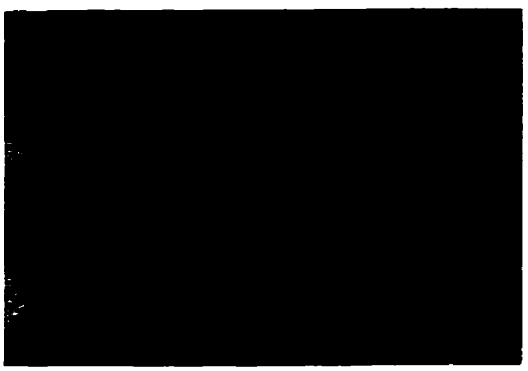


Figure III-10 : Le stent est introduit dans le tube en Silastic avec un fil chirurgical.

Figure III-11 : Le déploiement optimum du stent est assuré par un ballon gonflé à 12 atm.

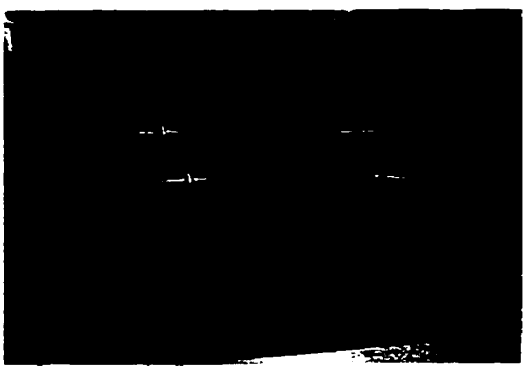


Figure III-12 : Photographie de la perfusion dans la chambre en plexiglass

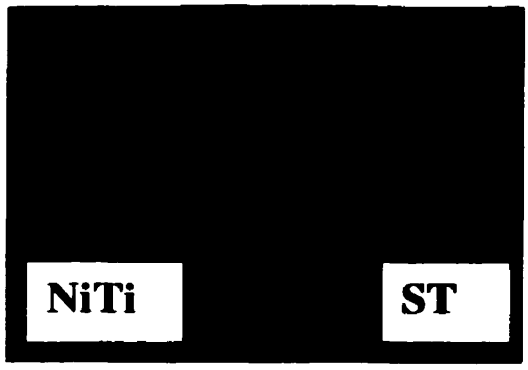


Figure III-13 : Photographie des stents après la perfusion (gauche: NiTi, droite: acier inoxydable (ST))

Ce système *ex vivo* nous a permis d'évaluer l'effet de la stérilisation sur la thrombogénicité relative de stents en NiTi électropolis. De plus, nous avons comparé la formation de thrombus sur des stents en NiTi et en acier inoxydable (de type 316L) électropolis et de même design sous deux taux de cisaillement différents (228 sec^{-1} et 456 sec^{-1}).

CHAPITRE IV - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

IV-1- Organisation des résultats

Ce travail de maîtrise a été articulé autour de trois axes majeurs. Le premier consistait à évaluer les modifications de surface induites par la stérilisation de disque en NiTi. Cette étude a été réalisée sur des disques électropolis, traitement de surface sélectionnés lors d'une précédente étude dans notre laboratoire (Trépanier *et al.*, 1999). L'objectif était de caractériser l'effet des techniques de stérilisation par autoclave, chaleur sèche, oxyde d'éthylène, plasma Sterrad et Plazlyte et décontamination à l'acide péracétique. Ces effets ont été évalués par l'intermédiaire des techniques suivantes : mesure de l'angle de contact pour calcul de l'énergie de surface, microscopie à force atomique pour la topographie, et spectroscopie Auger pour la composition chimique. Ces résultats ont été rassemblés dans l'article I, accepté pour publication dans le Journal of Biomedical Materials Research.

Le deuxième axe était, d'une manière générale, d'évaluer la résistance à la corrosion de l'alliage NiTi après stérilisation par les techniques d'autoclave, de chaleur sèche, d'oxyde d'éthylène, de plasma Sterrad et par la décontamination à l'acide péracétique. Préalablement, la résistance à la corrosion de disques et de stents en NiTi électropolis a été étudiée dans le but d'obtenir une meilleure compréhension de ces phénomènes. Ces tests de corrosion ont été effectués par le moyen de polarisation cyclique, ainsi que par des tests de perte de masse mesurée par absorption atomique. Ces résultats ont été soumis pour publication (Article II) dans le Journal of Biomedical Materials Research.

Dans le cadre spécifique de l'évaluation de stent en NiTi, notre troisième objectif était de déterminer l'effet éventuel de la stérilisation sur la thrombogénicité de ces stents. Cette

étude a été réalisée par l'intermédiaire d'un protocole de circulation extracorporelle dans un modèle de porc à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Pour pallier l'absence de données sur la thrombogénicité relative des stents en NiTi par rapport à ceux en acier inoxydable, des stents en NiTi reproduisant parfaitement le design de stents Palmaz (en acier inoxydable) ont été spécialement confectionnés et testés. Ces résultats ont été regroupé dans l'article III, intitulé "Effect of surface modifications induced by sterilization on the thrombogenicity of nickel titanium stents" et sera publié dans «Shape Memory Implants», Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – Tokyo.

IV-2- Effets de différentes techniques de stérilisation sur les propriétés de surface du NiTi:

Article I

Effects of sterilization processes on NiTi alloy - Surface characterization

Accepté pour publication dans: Journal of Biomedical Materials Research

EFFECTS OF STERILIZATION PROCESSES ON NiTi ALLOY SURFACE CHARACTERIZATION

B. Thierry[1], *M. Tabrizian[1], O. Savadogo[2], L'H. Yahia[1]

[1] Biomedical Engineering Institute - Mechanical Engineering Department, Biomaterial/Biomechanics Research Group (BBRG), Mechanical Engineering,
[2] Physics and Materials Engineering Department,

Ecole Polytechnique of Montreal, Montreal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montreal, Qc, H3C 3A7, Canada

Correspondence :

*Maryam Tabrizian, E-mail: tabrizia@grbb.polymtl.ca

Ecole Polytechnique of Montreal, Montreal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montreal, Qc, H3C 3A7, Canada

Abstract

Sterilization is required for using any device in contact with the human body. Numerous authors have studied device properties after sterilization and reported on bulk and surface modifications of many materials after processing. These surface modifications may influence, in turn, device biocompatibility. Still, data is missing on the effect of sterilization procedures on new biomaterials such as Nickel-Titanium (NiTi). Here, we report on the effect of dry heat, steam autoclave, ethylene oxide, peracetic cid and plasma-based sterilization techniques on surface properties of NiTi. After processing electropolished NiTi discs with these techniques, surface analyses were performed by Auger Electron Spectroscopy (AES), Atomic Force Microscopy (AFM) and contact angle measurements. AES analyses have revealed a higher Ni concentration (6% to 7% versus 1%) and a slightly thicker oxide layer on the surface for heat and ethylene oxide processed materials. Studies of surface topography by AFM have shown up to 3-fold increase of the surface roughness when discs were dry heat sterilized. An increase of the surface energy, up to 100%, was calculated for plasma treated surfaces. Our results have pointed out that some surface modifications are induced by sterilization procedures. Further work is required to assess the effect of these modifications on biocompatibility, and to determine the most appropriate methods to sterilize NiTi.

Key words: Nitinol, sterilization, surface roughness, surface composition, surface energy

INTRODUCTION

The properties of Nitinol's (NiTi), which is a nearly equi-atomic intermetallic compound of nickel and titanium, such as superelasticity and shape memory properties combined with its promising biocompatibility contribute to its increasing use as a biomaterial. Current biomedical applications that take advantage of these properties include stents for peripheral procedures, orthodontic archwires, microactuators, surgical tools, staples, clot filters and many others[1]. Recent *in vitro* studies reported by Assad *et al.*[2] and Wever *et al.*[3], as well as *in vivo* assays such as those performed by Trepanier *et al.*[4] and Ryhänen *et al.*[5], have shown very promising biological behavior for NiTi, encourage further investigations in this field. Despite these results and many successful clinical applications of NiTi[6], biocompatibility of this alloy still remains controversial. In spite of the expected stability provided by covalent-like bonds in the bulk material between titanium and nickel, the high percentage of nickel in the alloy and its possible diffusion to the surface due to various surface treatments, such as sterilization, give rise to concerns.

The biocompatibility of any biomaterial is related to the implant-body interactions and for metallic implants directly to the nature of their surface at the beginning and during the implantation. The chemical nature, the roughness and the surface energy are parameters that will define implant biocompatibility. It is well known that the surface of NiTi is essentially covered by a thin layer of titanium oxide. This oxide layer is expected to provide to NiTi alloy a good biocompatibility and corrosion behavior, similar to that of titanium alloys. Since sterilization is the final step in manufacturing any implant device, the effect of sterilization processes on the modification of the first surface layers of these biomaterial surface must be clearly understood and characterized. Furthermore, the relation between the physico-chemical factors and the tissue response must also be investigated. Moreover, requesting a well-controlled surface before implantation emphasizes these needs.

In a recent study, Shabalovskaya *et al.* reported the correlation between the surface chemical composition and some sterilization treatments[7,8]. A similar study on commercially pure titanium showed also the potential damaging effect of some sterilization treatments such as ethylene oxide and steam autoclave on *in vitro* biological response[9]. Results on the effect of sterilization processes on the mechanical properties of NiTi endodontic wires have shown that the heat sterilization-based techniques were able to slightly modify the bulk properties of NiTi[10].

The aim of this work was to study the effects of the most accessible sterilization techniques on NiTi alloy, namely steam autoclave, dry heat, ethylene oxide, plasma sterrad® and plazlyte® and peracetic acid. Sterilized NiTi surfaces were studied using Auger Electron Spectroscopy (AES) combined with ion sputtering, Atomic Force Microscopy (AFM), and Static Contact Angle Measurements (CAM) to characterize the modification on oxide layer thickness, contamination, chemical composition, surface topography, and surface energy.

MATERIAL

Nearly equi-atomic NiTi alloy (55.5 weight% Ni, balance Ti) was used for this study. Twelve-mm diameter discs were provided by Nitinol Devices & Components (Fremont, CA). All discs were first mechanically polished through a 1-μm diamond paste. After this mechanical polishing, samples were electropolished (EP) according to standard process for metallic biomaterials.

Table IV-1

Description of samples and sterilization techniques and conditions

	Treatments	Techniques	Conditions
EP	Mirror polishing + electropolishing	Nitinol Devices & Components (Fremont, CA)	ASTM standards
SA	EP + steam autoclave	Amsco 3043	270° F, 4 min, ~30 psi
DH	EP + dry heat	-	270°F, 60 min
EO	EP + ethylene oxide	Steri Vac 5XL	130°F, 2h10 min, ~10 psi,
PA	EP + peracetic acid decontamination	Steris I Steris Corp, Mentor, OH	52°C, 12 min, C= 0.2 %, peracetic acid
PS	EP + hydrogen peroxide plasma	Sterrad®-100S ASP, J&J, Irvine, CA	R.F. primary plasma (400 watts, 15 min) with H_2O_2 chemical phases
PP	EP + peracetic acid plasma	AbTox Plazlyte™ System AbTox inc., Mundelein, IL	Low temperature plasma with peracetic acid chemical phases

Seven different EP groups of samples were processed (one cycle) under clinical conditions by common sterilization processes used in hospitals' including dry heat (DH), steam autoclave (SA), ethylene oxide (EO), hydrogen peroxide plasma (PS) (Sterrad-100S®, ASP, J&J, Irvine, CA), peracetic acid plasma (PP) (Plazlyte®, AbTox inc., Mundelein, IL) and peracetic acid decontaminator (PA) (Steris Corp, Mentor, OH) (Table IV-1). Non-sterilized EP samples were used as controls.

METHODS

Auger Electron Spectroscopy (AES)

AES analyses were performed by a JAMP-30 Auger system (JEOL, Tokyo, Japan) in derivative mode at 10 keV with an electron beam current of 0.5 μA. AES survey spectra

(50-1500 eV) were recorded from at least two different locations on the samples (n=3). Depth profiles (0-500 nm) were measured by combining AES spectra analyses and ion sputter etching.

Oxide thickness was estimated by measuring the time of sputtering for the oxygen peak to reach half its maximum concentration. The thickness in terms of sputtering time was converted to depth units in nanometers using the sputtering rate 14.3 nm/min calibrated for a SiO_2 standard[11]. This approach is based on the similarity of densities between NiTi and SiO_2. The use of this method will however slightly overestimate the oxide thickness on NiTi because of the higher density of SiO_2.

Relative concentrations (in atomic percentage) of the detected elements were calculated from their peak-to-peak values in differential AES spectra using the following equation :

$$X_i = (I_i / \alpha_i) / \sum_{j=1}^{N} (I_j / \alpha_i)$$

where I and α are the peak-to-peak intensity of the Auger peaks and the relative sensivity factor for the considered elements respectively, and N is the number of elements. Corrections of these values were done with tabulated elemental sensivity factors and experimental measurements[12].

Atomic Force Microscopy (AFM)

A Topometrix TMX 2010 (Santa Clara, CA) was used to image the topography of the sterilized samples. In this study, two AFM imaging magnification levels were used for a detailed characterization of the surface topography. Areas of 50 μm × 50 μm for gross scale and 10 μm × 10 μm were scanned by Si_3N_4 tips. Samples of each group (n≥ 2) were analyzed at five random locations in contact (repulsive) mode. Roughness analyses were

performed to determine the average Roughness (R_a) and the Fractal dimension (F_d). The average Roughness was calculated from :

$$Ra = \frac{1}{N}\sqrt{\sum_{i}^{N} Z_i^{\,2}}$$

where Z_i is the distance of the ith pixel from the best fit plane of the picture and N is the number of pixel in the image (256×256). Usually, the fractal dimension of a surface is characterized by only one decimal fluctuated between 2 and 3[13]. The increase of fractal dimension to higher values and/or increasing in average roughness value means an increase of surface roughness. For example, when comparing 2 different surfaces, similar R_a and different F_d will indicate a variation in the roughness distribution homogeneity.

Contact Angle Measurements (CAM)

Static Contact Angle studies were performed by a Video Contact Angle System (VCA 2500, Ast, Billerica, Ma) using one µl droplet of liquid on the samples surfaces. The contact angles were then determined semi-manually from the droplet image within a precision of ±2°.

The pendant-drop technique provided by the system was used to estimate the surface energy using the geometric mean calculation method with distilled water and formamide[14]. Theoretical differences in polar and dispersive values for these two liquids (γ_{lv}^{water}= 22.1 (disp) + 50.7 (polar) = 72.8 dyne/cm versus $\gamma_{lv}^{formamide}$= 39.5 (disp) + 18.7 (polar) = 58.2 dyne/cm) and the estimated surface energy of water (γ=74 dyne/cm) and formamide (γ=54 dyne/cm) were employed to determine the polar and dispersive components of the two liquids by linear regression. Using these values, the surface energy of the material as a function of sterilization process was estimated[15]. Samples were stored

at room temperature in their sterile package to avoid contamination prior to testing. Contact angle measurements were performed within 1 week after sample processing.

Statistical Analyses

Data are presented as mean ± SD. Statistical analyses were performed using the student-T test to determine statistically significant differences in the oxide layer thickness, average roughness and contact angle of processed samples in comparison with controls (EP). A p-value under 0.05 was accepted as significant.

RESULTS

AES analyses

The effect of sterilization process on NiTi surface was investigated with AES analysis to determine the elemental composition of the sterilized surfaces. As expected, spectra analysis in derivative mode (dI(intensity)/dE(energy) as a function of electron energy[11]) showed the presence of oxygen (~510 eV), titanium (~418 eV), carbon (~272 eV) and, depending on the sterilization processes, nickel (~848 eV). These results confirmed that NiTi surface is mainly composed of a thin layer of titanium oxide with small amount of nickel (Fig. IV-1). In addition to carbon, common inorganic contaminants in concentration below 5% included nitrogen (~381 eV, overlaps with a titanium peak), phosphorus, calcium, chlorine, sodium, iron, silicium, aluminum and sulfur were also detected. Moreover, macroscopic discoloration could be visually detected on some ethylene oxide and steam autoclave sterilized surface.

The relative concentration of O, Ti, Ni and C calculated from the AES spectra and reported in Table IV-2, should not be considered as absolute surface concentrations. Nevertheless, relative comparison among the sterilization processes, themselves, and unsterilized electropolished discs as controls could be assessed. The elemental surface composition calculation indicated that the amount of nickel on the surface varied from less than 1% to 7% and titanium from 10% to 25% as a function of sterilization processes.

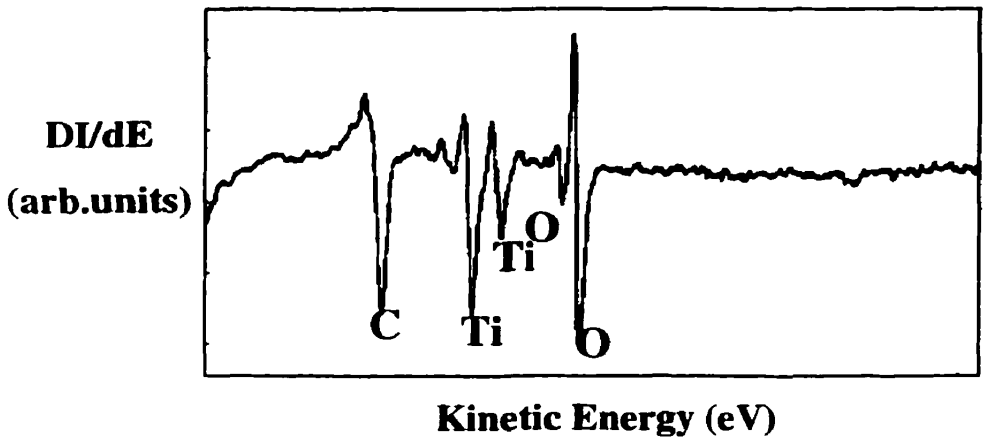


Figure IV-1: Typical AES survey spectra for Electropolished samples

As shown in Table IV-2, Plasma-based treatments did not seem to modify the chemical composition of the surface, resulting in a surface almost free of nickel similar to those observed with electropolishing. However, dry heat processes, and to a lesser extent peracetic acid decontamination, enhanced the diffusion of metallic species, i.e. both nickel and titanium, from the inner surface. In contrast, steam autoclave and ethylene oxide sterilization promoted only an increase in superficial nickel concentration (about 5% for ethylene oxide treatments and about 6% for steam autoclaving).

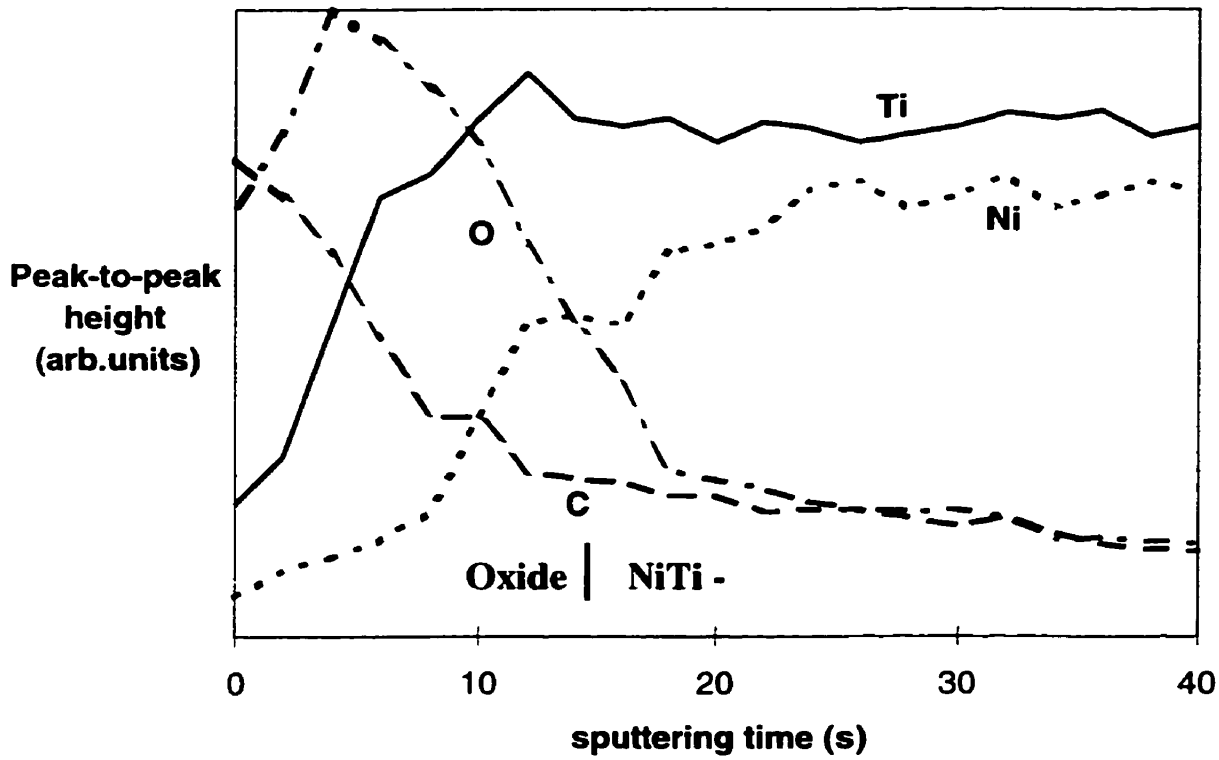


Figure IV-2: Typical depth profile for Electropolished samples

Typical AES depth profile spectra for electropolished surfaces are presented in the Figure IV-2. The depth profiles for O, Ti, Ni and C showed a similar qualitative feature for all samples. The sharp decrease of carbon along with an increase in oxygen signal at the beginning of sputtering time suggested that the hydrocarbon contamination was limited only to some molecular monolayers. After a bit longer sputtering time, the O signal decreased to its constant concentration along with an increase of Ti and Ni from bulk materials.

The determination of oxide layer thickness indicated an average thickness of 4 nm for electropolished samples. As reported in Table IV-2, dry heat, steam autoclave and ethylene oxide seemed to result in a slightly thicker oxide in comparison to

electropolished controls although these variations were not significant. In contrast, peracetic acid, plasma Sterrad®, and plasma Plazlyte® treatments did not modify the thickness. However, steam autoclave and ethylene oxide sterilization resulted in very heterogeneous thickness of the oxide that could not be precisely quantified.

Table IV-2

Surface characteristics of NiTi samples as measured by AES as a function of sterilization processes

Sample	Chemical Composition (atm. %)				Oxide layer thickness (nm)
	O	Ti	Ni	C	
EP	~33	15 ±2	<1	~50	4±0.4
SA	~25	16 ±5.5	6±3.1	~51	8±3.4
DH	~33	25 ±5	7±2.2	~33	6±1.1
EO	~24	12 ±4	5±2.5	~57	7±3.6
PA	~37	20 ±3	3±1.1	~38	3±1.2
PS	~30	15 ±2.5	1.5±0.4	~52	3±0.5
PP	~22	10 ±3	<1	~67	4±0.4

AFM Studies

By AFM analyses, average Roughness (R_a) and Fractal dimension (F_d) of surface of samples were determined. The results of our image analyses on processed NiTi discs are summarized in Table IV-3. The value of R_a (5 nm) for control samples was an indication of a smooth and relatively uniform surface for those samples. The R_a trended to higher values for sterilized materials, particularly for steam autoclave processed, indicating an increase in surface roughness. However the comparability in F_d values for majority of

sterilization modes (from 2.25 to 2.3 except for SA and PS) indicates that the defects in the surface are distributed uniformly.

Figures IV-3 (a-f) illustrate the shaded images and roughness profile of samples' surface. As shown in Figure IV-3.b, for samples sterilized with plasma (PP and PS), surface topographies similar to controls were noticed. However, AFM analyses showed rougher surfaces for Sterrad-100S® and Plazlyte® compared with controls (R_a=5 nm versus 10 nm and 11 nm). Sterrad-100S® seemed to change the roughness distribution on the surface as indicated by a relatively high fractal dimension (~2.4 versus 2.7). Figures 3.c and 3.d illustrate the images and the roughness profiles for dry heated and autoclaved samples respectively where the effects of treatments can be observed. Increasing of both microscale roughness (5 versus 15 nm, $p<0.05$) and fractal dimension (2.2 versus 2.4) indicated the changes on NiTi surfaces by dry heating. Steam autoclaved surfaces were found to be very heterogeneous with significantly rougher surfaces (5 versus >25 nm, $p<0.05$) than controls while some random cracks and pits were observed. In spite of a relatively smooth surface, randomly distributed pits in the case of peracetic acid and the presence of residues on ethylene oxide processed materials could be observed (Fig. IV-3.e and IV-3.f).

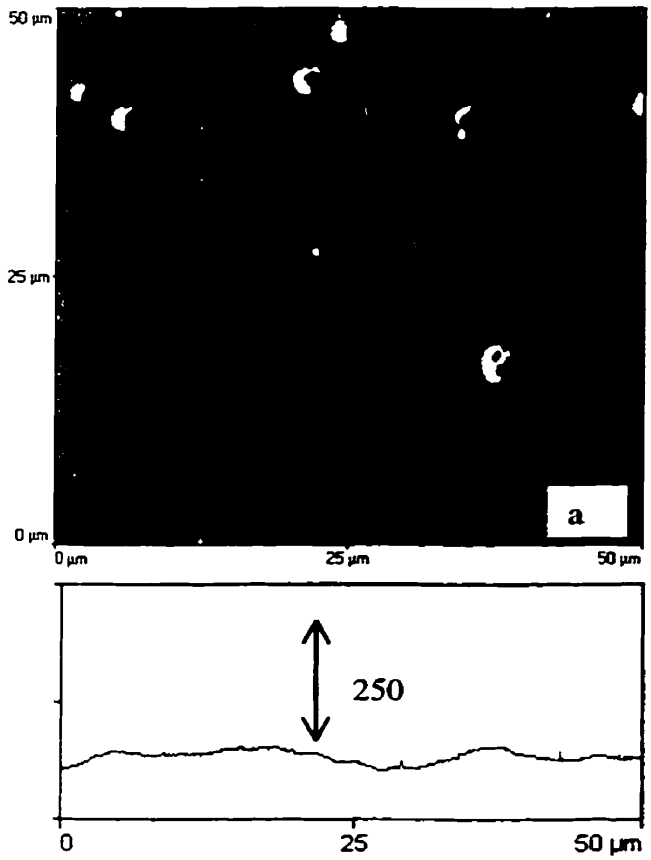
Table IV-3

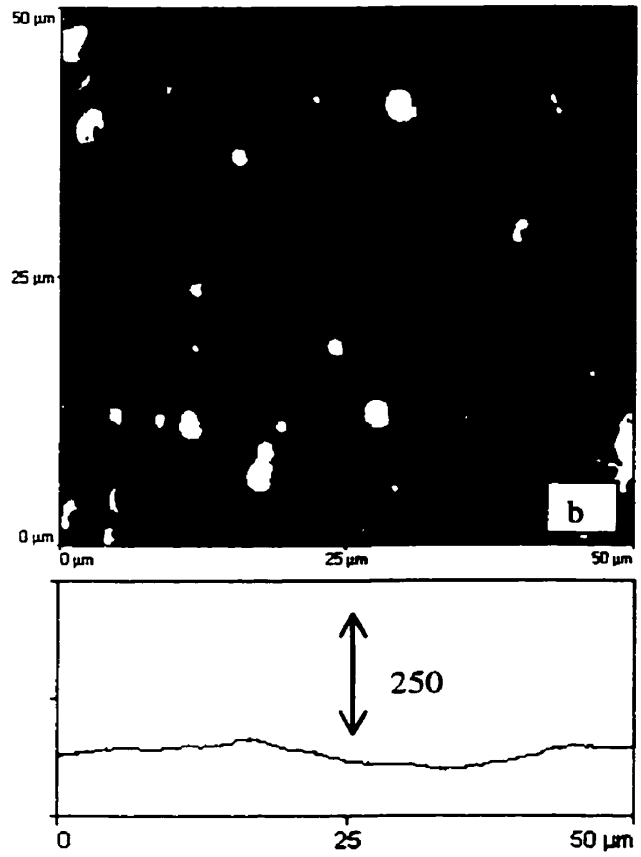
The relationship between surface characteristics and sterilization processes as observed by AFM

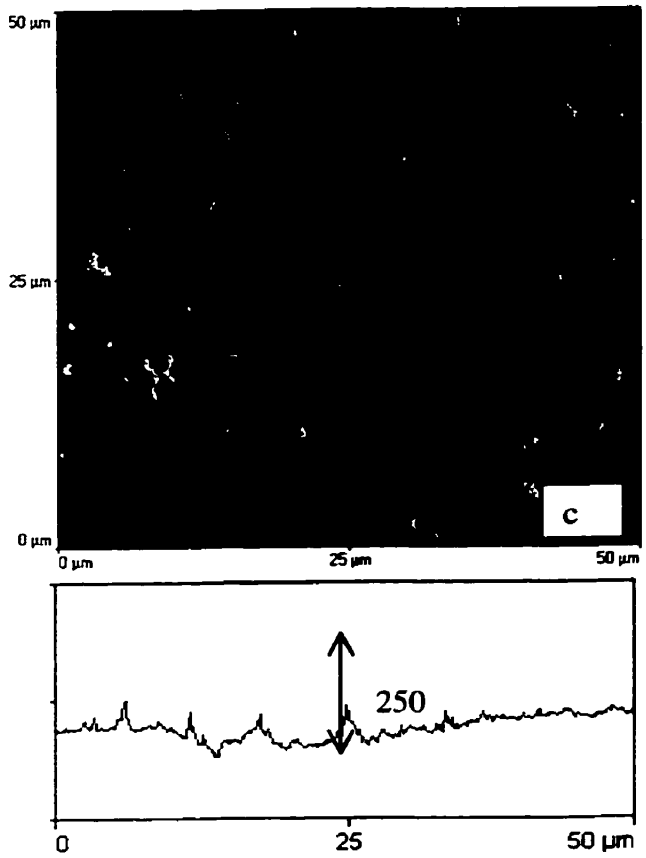
Sample	50 µm × 50 µm scale	10 µm × 10 µm scale	
		R_a (nm)	F_d
EP	Smooth, traces of polycrystalline oxide growth	5	2.25
SA	Rough, heterogeneous, randomly distributed pits	> 25(*)	-
DH	Rough, homogeneous	17(*)	2.45
EO	Smooth, deposit	10	2.3
PA	Smooth, randomly distributed pits	6	2.3
PS	Medium roughness, traces of polycrystalline oxide growth	11	2.7
PP	Medium roughness, traces of polycrystalline oxide growth	10	2.4

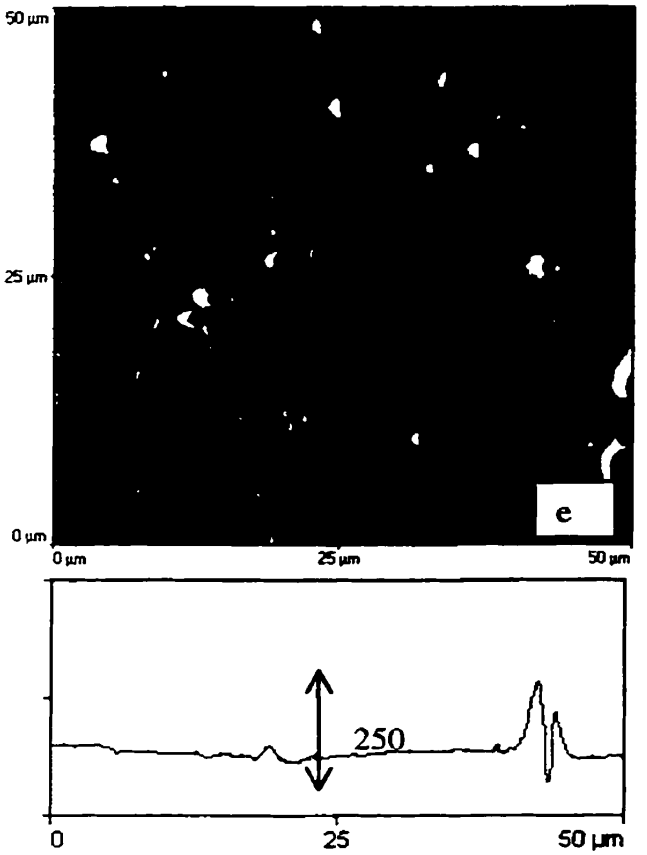
(*) $P<0.05$ versus EP

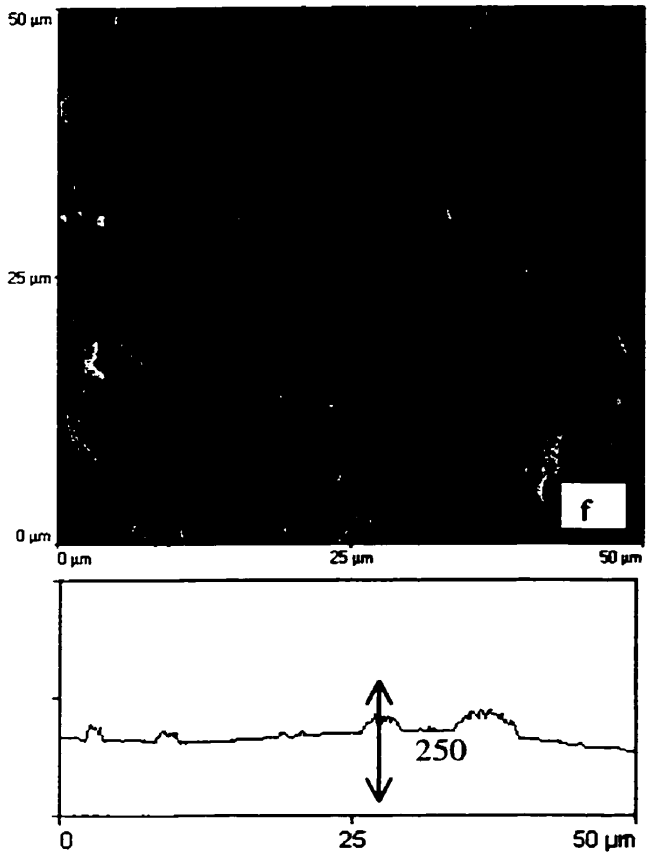
Figure IV-3: (a-f): (following pages) AFM images and profile roughness as a function of sterilization processes; a) EP, b) PS, c) DH, d) SA, e)PA, f) EO


50 µm
25 µm
0 µm
0 µm
25 µm
50 µm
a
250
0
25
50 µm


50 µm
25 µm
0 µm
b
0 µm
25 µm
50 µm
250
0
25
50 µm


50 µm
25 µm
0 µm
0 µm
25 µm
50 µm
c
250
0
25
50 µm


50 µm
25 µm
0 µm
0 µm
25 µm
50 µm
e
250
0
25
50 µm


50 µm
25 µm
0 µm
0 µm
25 µm
50 µm
f
250
0
25
50 µm

Contact Angle Measurements

Our preliminary tests showed that equilibrium value of contact angle is achieved within a few seconds. Contact angles and corresponding surface energies as a function of sterilization indicated differences between samples (Fig. IV-6 and Table IV-4). The control group presented a mean water contact angle of 67° and a corresponding surface energy of 36.1dyne/cm. Plasma based sterilizers, peracetic acid decontaminator and dry heat sterilization produce more hydrophilic surfaces. As shown on Figure IV-6 and Table IV-4, plasma Sterrad® and plasma Plazlyte® produced highly energetic (74.3 dyne/cm and 72.4 dyne/cm respectively) and polar surfaces corresponding to a significantly lower contact angle (~15° versus 67°, $p<0.05$). Dry heat sterilization resulted in a mean contact angle of 42° and a surface energy of 53.5 dyne/cm. Steam autoclave sterilization process produced a very heterogeneous surface: depending on the analyzed area, the value of the contact angle was between 40° and 90°. Slightly lower contact angles were observed with ethylene oxide in comparison to electropolished controls discs.

Table IV-4

The effect of sterilization processes on static contact angle and surface energy

Sample	Water contact angle (°)	Formamide contact angle (°)	γ polar (dyne/cm)	γ disp. (dyne/cm)	γ (dyne/cm)
EP	67 ±4	55 ±6	21.5	14.6	36.1
SA	76 ±17	-	-	-	-
DH	42 ±7 (*)	45 ±7	44.3	9.2	53.5
EO	60 ±9	45 ±8	24.4	17.8	42.2
PA	50 ±7	50 ±4	44	7.7	51.7
PS	16 ±2 (*)	21 ±3 (*)	64.6	9.7	74.3
PP	18 ±3 (*)	15 ±3 (*)	60.8	11.6	72.4

DISCUSSION

The promising biocompatibility of NiTi alloy is attributed to the presence of a uniform and homogeneous TiO_2 surface oxide layer[16]. Indeed, in the presence of oxygen, titanium alloys are covered spontaneously by a TiO_2 oxide layer, which promotes their good biocompatibility and their excellent resistance to corrosion processes. Moreover, the protective effects of this oxide film seem to be enhanced during implantation by the deposition of a calcium phosphate layer on the surface as reported by Demri *et al.*[17] and Hanawa *et al.*[18] on titanium surface. As shown by our results, the electropolished NiTi alloys were covered by a ~ 4 nm thick titanium oxide layer, with a small amount of nickel at the surface. We found that this oxide layer can be altered by sterilization process, which may induce changes in surface characteristics and thus modify the corrosion behavior and biocompatibility of the alloy. Despite of the lack of data on the effects of sterilization processes on NiTi alloy, our results can be discussed by comparing our data to those obtained for Ti-based or other metallic implants.

First, AES results have shown an O/Ti ratio of about 2 for all samples, indicating a TiO_2-like stoechiometry for the superficial oxide (Figure IV-4). This finding was confirmed by the feature of the AES Ti_{LMV} peak[19]. As presented in Table IV-2, a relatively constant concentration of oxygen (~30%) and a variation in carbon concentration have been observed. This result suggested that the main surface contamination was composed of hydrocarbons. The random macroscopic discoloration on some ethylene oxide processed and steam autoclaved surfaces observed in our samples have been reported also with these sterilization techniques on titanium surfaces[9]. This characteristic has been related to the increase of the oxide thickness and the surface contamination, which might explain the high heterogeneity demonstrated with AES, AFM and contact angle measurements on some processed surfaces. It must be mentioned that steam autoclave and ethylene oxide use similar sterilization conditions such as pressure and humidity and this may explain some of the similarities in results with these two techniques. Surface contamination, such

as Cl, Fe, Na, and Ca, detected by AES analyses as well as the discoloration on some samples resulting in from residues left on the surface after water condensation, highlighted the need for pure steam for such sterilization treatments. In a recent *in vitro* study, Vezeau *et al.* emphasized the need for a well-controlled and clean surface before implantation[9]. They have shown that the level of contamination increased with the number of exposure cycles by both autoclave and ethylene oxide, which decreased the *in vitro* level of cell attachment and spreading of murine fibroblasts.

As reported by many authors, inorganic contaminants[20] and smoother surfaces[21,22] are expected to decrease the surface energy of metallic surfaces. This could explain relatively high contact angles (sometimes greater than 90°) for heterogeneous surfaces produced by steam autoclaving. Because of the high polarity of the Ti-O bond of the oxide layer, NiTi alloys are expected to present a hydrophilic surface[23]. Our results showed that plasma sterilization increased the polar components of the surface energy in comparison to electropolishing, which might indicate a low level of contamination on the TiO_2 surface layer treated by plasma sterilization. The increase of surface wettability with plasma-based techniques and, in a lesser extent, with peracetic acid and heat-treated samples suggested that these treatments were able to produce more hydrophilic surfaces. Such an increase could have a beneficial effect on the biocompatibility of sterilized devices[24,25,26]. Indeed, surface energy is one of the properties that influence the adhesion of cells and bacteria.

In addition to the role of wettability on the biocompatibility behavior of implants, many authors have studied the effect of surface topography on the tissue response. However, because of the wide range of surface tissue interaction, the suitable scale at which surfaces should be characterized, remains uncertain. Studies have pointed out the dependency of biocompatibility on surface conditions in regard to implantation site. For example, it has been shown that smooth titanium surfaces interact better with soft tissue whereas rough surfaces were more suitable for tissue formation and implant integration in

contact with the bone [27,28]. For cardiovascular stenting applications, smooth surfaces are required for a good haemocompatibility of such devices[29,30].

As a first step in sample preparation, mechanical polishing produced a plastically deformed top layer on the polycrystalline bulk material. AFM analyses of these samples revealed very smooth surfaces (Ra=3.1 nm), and no grain structures could be distinguished (data not shown). The surface roughness increased to 5 nm for electropolished samples and some heterogeneity observed on AFM images suggested that the removal of the top layer was followed by the growth of an oxide from the underlying grain of the polycrystalline bulk material [21,31]. We found that the sterilization techniques were able to modify the roughness of NiTi alloys surfaces. Among all treatments, plasma-based sterilization processes seemed to induce less surface modification. The similarity between the electropolished and plasma-processed surfaces was confirmed by AES studies which shared the relatively similar thickness of the surface oxide. This result suggested that the growth rate during the oxidation was very low. However, AFM showed a slight increase of the surface roughness for Sterrad-100S® and Plazlyte®. Increasing of the roughness indicated the damaging effect of dry heating and autoclaving on NiTi surfaces. The presence of cracks and pits on steam autoclaved samples, similar to the randomly distributed pits on the surface of peracetic acid processed samples might suggest a premature corrosion process initiated by the acidic pH of media. This may be a concern for long term biocompatibility since corrosion resistance is one of the greatest issues of metallic biomaterials. Unless this visible feature, the peracetic acid processed surfaces were relatively smooth, similar to that of ethylene oxide treated samples and R_a and F_d were close to values obtained for electropolished controls surfaces. However, when considering AFM data, one must be aware of the artifact effects of Si_3N_4 tips used in this study. Knowing that the pyramidal shape of tips can not followed sharper structure of the same dimension, the roughness of the surface is underestimated due to the convolution of the tip with the real topography of the samples.

The potential release of Ni from the surface following implantation is another important issue in biocompatibility of NiTi alloys. The harmful effect of metallic Ni, reported by Berger-Gobet *et al.*[32] and Takeshita *et al.*[33] was described by a significantly lower percentage of bone in contact with NiTi in comparison to materials such as Ti, Ni and Ti-6Al-4V. A homogeneous and pre-passivated TiO_2 surface, enhanced by electropolishing, limits the release of metallic ions from NiTi implant during passive dissolution. Moreover, it can prevent the oxide growth occurring during implantation, observed on titanium implant[34], and by then the release of Ni^{2+} ions from NiTi alloys. Since the release of nickel from the biomaterial is expected to be controlled by the amount of nickel in the outermost surface as well as the homogeneity and the thickness of the TiO_2 film[35], any modification in the NiTi surface needs to be characterized before implantation. In a recent study, Shabalovskaya *et al.*[8] have shown the toxic effect of high amount of nickel on the surface on *in vitro* cell proliferation rate, due to the exposure of sample to an oxidative agent such as H_2O_2 but pointed out the obvious lack of data on the understanding of the effects of the nickel state on the tissue response. From our results, decontamination with an oxidant agent such as peracetic acid seemed to enhance also the diffusion of metal from the inner surface. The nickel concentration increased to 3%. Plasma-based treatments did not modify the chemical composition of the surface in comparison to electropolishing, resulting in surface with very low amount of nickel (Figure 4). In contrast, steam autoclave, dry heat and ethylene oxide sterilization processes slightly enhanced the diffusion of nickel to the surface but had various effects on the diffusion of titanium. A recent study by Vichev *et al.*, related the increasing effects of thermal treatments on the oxide layer of NiTi alloys to the thermal oxide growth in thin film similar to those observed by many authors with other metallic implants[36]. Moreover, they found the outermost layers of the alloy to be rich in nickel followed by a pure layer of TiO_2. Our results can be related to such phenomena, since we observed this nickel enriched superficial layer, even if the increase in oxide layer was not statistically significant. However, as a pretreatment, electropolishing tends to create a surface almost free of defects, and by the latter reduces the growth of thermal oxide when samples are

submitted to heat-based sterilization processes[37]. Regarding these points, further studies are required for a better understanding of the selective diffusion of metallic ions during the oxide growth following preparative treatments as well as *in vivo* implantation.

The diffusion of ions to the surface affected Ti/Ni ratio as an indication of changes in oxide layer surface. As shown in figure IV-4, a lower Ti/Ni ratio was calculated for steam autoclaved and ethylene oxide samples whereas plasma-based treated discs presented a value similar to electropolished ones. The relatively high concentration of Ni observed with ethylene oxide, steam autoclave and dry heat processed surfaces, related to the low Ti/Ni ratio, might indicate the presence of higher percentage of superficial intermetallic components[38].

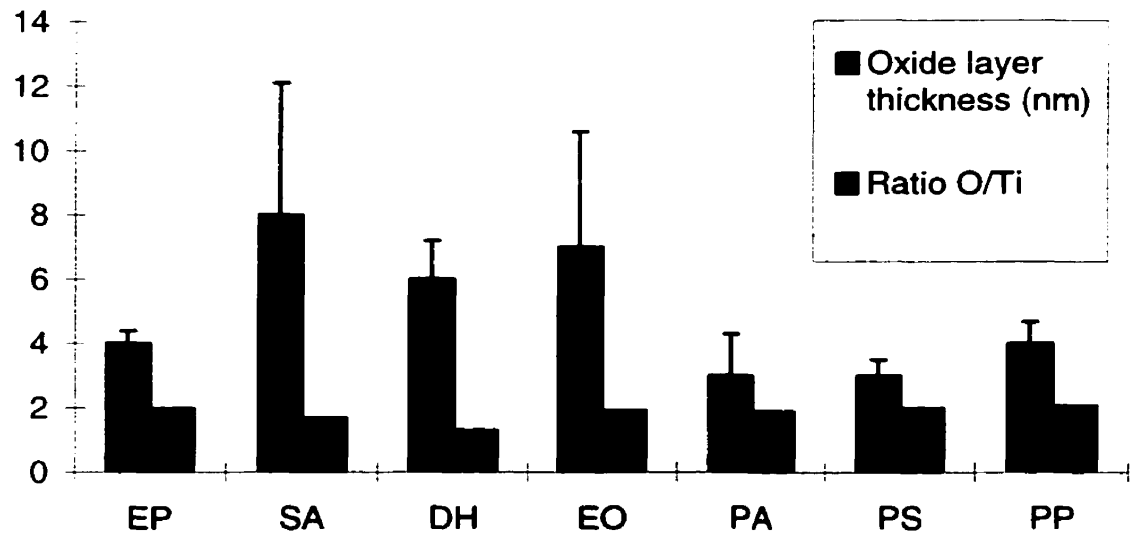


Figure IV-4: The variation of oxide layer thickness and O/Ti ratio for processed samples by various sterilization techniques

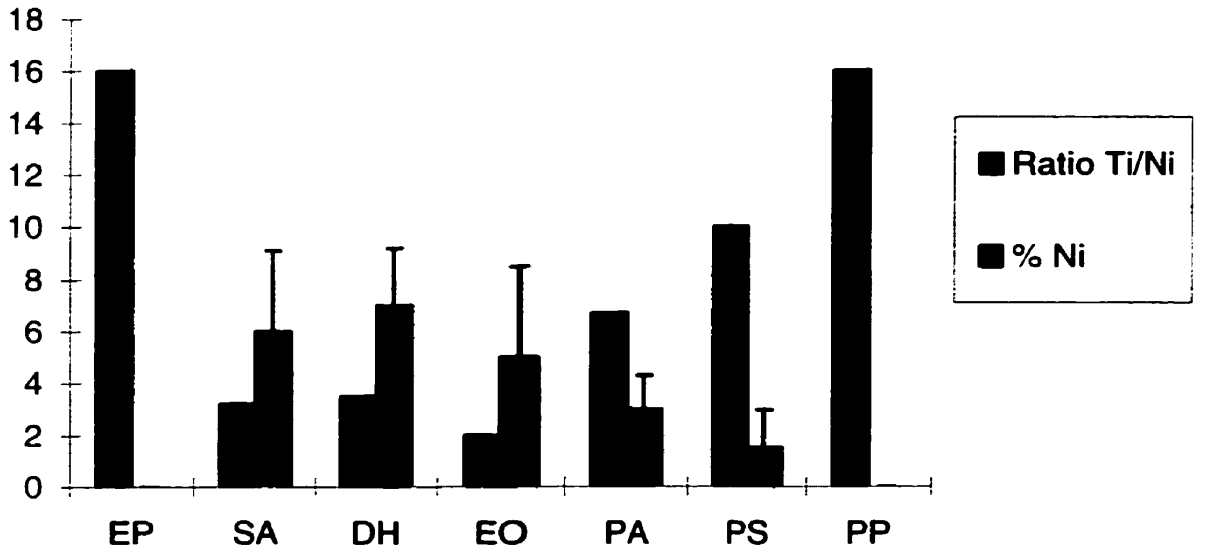


Figure IV-5: Superficial nickel concentration and Ti/Ni ratio as a function of sterilization processes

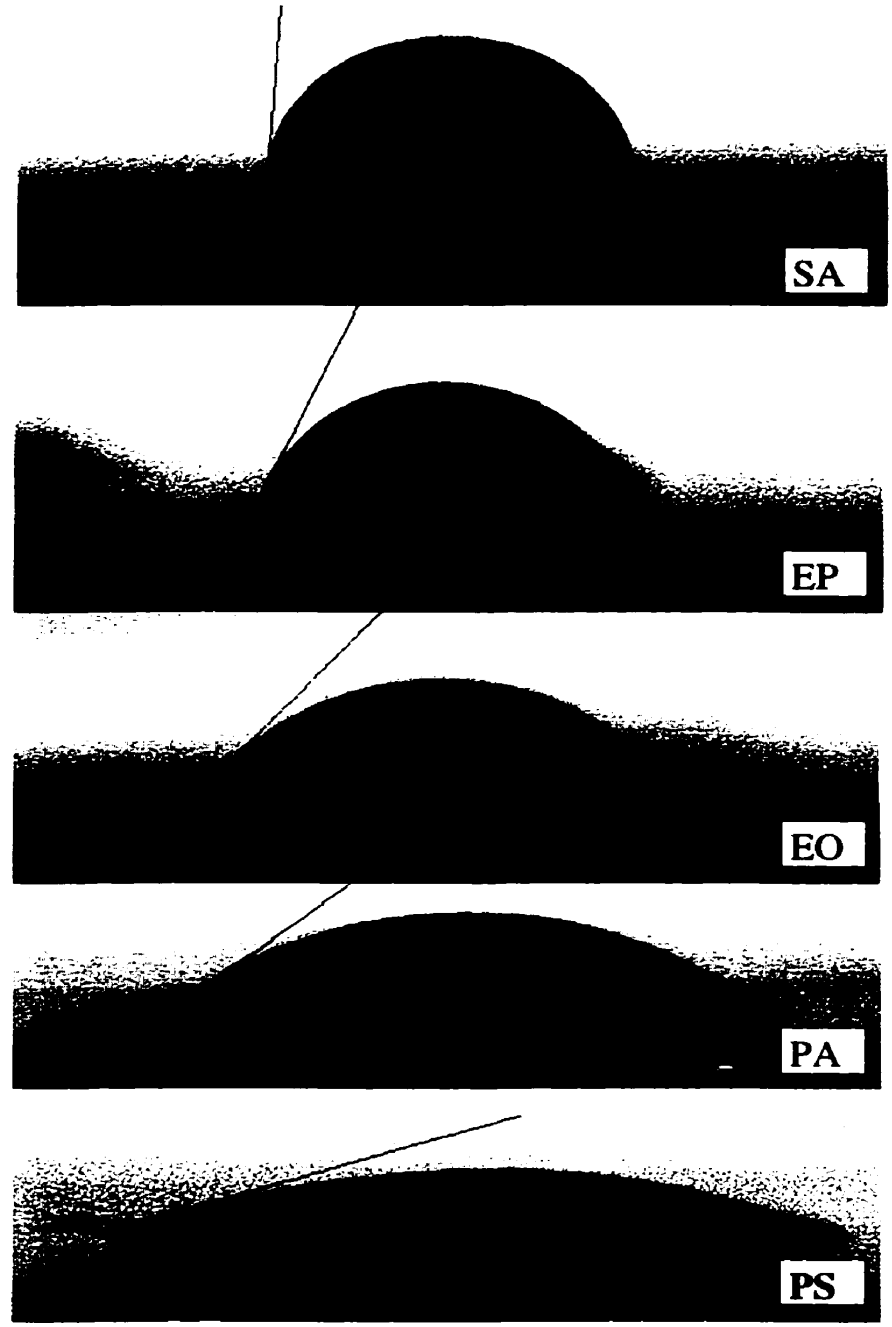


Figure IV-6: Changes of static contact angle versus sterilization processes for NiTi discs

Table IV-5-a

Comparative statistical analyses of static contact angle with water (θ_{water})

	EP	SA	DH	EO	PA	PS	PP
EP	*	NS	<.05	NS	<.05	<.05	<.05
SA	NS	*	<.05	<.05	<.05	<.05	<.05
DH	<.05	<.05	*	<.05	NS	<.05	<.05
EO	NS	<.05	<.05	*	<.05	<.05	<.05
PA	<.05	<.05	<.05	NS	*	<.05	<.05
PS	<.05	<.05	<.05	<.05	<.05	*	NS
PP	<.05	<.05	<.05	<.05	<.05	<.05	*

Table IV-5-b

Comparative statistical analyses of average roughness (R_a)

	EP	SA	DH	EO	PA	PS	PP
EP	*	<.05	<.05	NS	<.05	<.05	<.05
SA	<.05	*	NS	NS	<.05	NS	NS
DH	<.05	NS	*	NS	<.05	NS	NS
EO	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
PA	NS	<.05	<.05	NS	*	NS	NS
PS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
PP	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*

CONCLUSIONS

In the last years, new low temperature sterilization techniques such as plasma-based and peracetic acid decontamination have been employed, along with the common ethylene oxide, steam autoclave and dry heat techniques in hospitals. However, there is an obvious lack of data on the effects of these sterilization processes on biomaterials in general, and on NiTi alloy specifically. In this paper we discussed our results in regards to the limitation of these processes for the sterilization of NiTi alloy.

Different sterilization processes have been carried out on NiTi discs. The surface modifications were characterized by monitoring the surface chemical composition and oxide layer, the topography and the surface energy using AES, AFM and static contact angle measurements. Results were compared with works reported in literature on other metallic implant materials.

Obviously, all sterilized NiTi samples were covered by a passivating native oxide layer with various thickness, chemical elemental composition and roughness. We have shown that sterilization processes could modify the chemical surface of NiTi alloys and the amount of nickel on the surface. Among all sterilization treatments, plasma based sterilization had much less effect on the oxide layer thickness, roughness and morphology versus other techniques. Heat processes seem to be the most modifying for the surface topography of the alloy. Dry heated, steam autoclaved and ethylene oxide treated surfaces presented thicker oxide layers with slightly higher amount of nickel in comparison to controls. However, any techniques did not increase dramatically the roughness nor the amount of nickel on the surface of NiTi alloys.

As a part of on going studies, work are carrying out to examine the corrosion resistance of sterilized NiTi alloys, and to relate the surface physico-chemical properties to the *in vivo* and *in vitro* response of sterilized samples.

This work was partly supported by NSERC. We thank Nitinol Devices & Components (Fremont, CA) for their technical and financial support and specially Christine Trepanier for her help and advice; Mr. Eric Boutin, Mr. Gerard Guerrin and Ms. Carole Massicotte for their skillful technical assistance. We also wish to thank St Eustache hospital, Charles Lemoyne Hospital, le Centre de la santé de l'Estrie.

References

---

[1] W.V. Moorleghem, M. Chandrasekaran, D. Reynaerts, J. Peirs, H.V. Brussel, "Shape memory and superelastic alloys: The new medical materials with growing demand," *Biomed. Mater. Res.*, **8**, 55-60 (1998)

[2] M. Assad, L'H. Yahia, C.H. Rivard, N. Lemieux, "In vitro biocompatibility assessment of a nickel-titanium alloy using electron microscopy in situ end labeling (EM-ISEL)," *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 154-161 (1998)

[3] D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, M.M. Sanders, J.M. Schakenraad, J.R. Van Horn, " Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy," *Biomaterials*, **18**, 1115-1120 (1997)

[4] C. Trepanier, T.K. Leung, M. Tabrizian, L'H. Yahia, J.-G. Bienvenu, J.-F. Tanguay, D.L. Piron, L. Bilodeau, "Preliminary investigation of effects of surface treatments on biological response to shape memory NiTi stents," *J. Biomed. Mater. Res.*, **48**, 165-171 (1999)

[5] J. Ryhänen, M. Kallioinen, J. Tuukkanen, J. Junita, E. Niemelä, P. Sandvik, W. Serlo, " *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy : Muscle

and perineural tissue responses and encapsule menbrane thickness," *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 481-488 (1998)

[6] K. Dai, Y. Chu, "Studies and application of NiTi shape memory alloys in the medical field in China," *Biomed. Mater. Eng.*, **6**(4), 233-240 (1996)

[7] S. Shabalovskaya, J. Andereeg, "Surface spectroscopic characterization of NiTi equiatomic shape memory alloys for implants," *J. Vac. Sci. Technol.* **A, 13** (5) (1995)

[8] S. Shabalovskaya, J. Cunnick, J. Andereeg, B. Harmon, R. Sachdeva, "Preliminary data on in vitro study of proliferative rat spleen cell response to NiTi surfaces characterized using ESCA analysis," Proceeding of the International Conference on Shape Memory and Superelasticity, Pacific Grove, California, USA (1994)

[9] P.J. Vezeau, G.F. Koorbusch, R.A. Draughn, J.C. Keller, "Effects of multiple sterilization on surface characteristics and *in vitro* biologic responses to titanium," *J.Oral Maxillofac. Surg.*, **54**, 738-746 (1996)

[10] J. Silvaggio, L.M.M. Hicks, "Effect of heat sterilization on the torsional properties of rotary nickel-titanium endodontic files," *J. endodontics*, **23**, 12, 731-734 (1997)

[11] J.L. Ong, L.C. Lucas, "Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces," Biomaterials, 19, 455-464 (1998)

[12] L.E. Davis, N.C. MacDonald, P.W. Palmberg, G.E. Riach, R.E. Weber, Handbook of Auger Electron spectroscopy, Physical Electronics, Eden

[13] J.M. Gomez-Rodriguez, "Fractal characterization of gold deposits by scanning tunneling microscopy," Vac. Sci. Technol. B, **9** (2) (1991)

[14] S. Agathopoulos, P. Nikolopoulos, "Wettability and interfacial interactions in bioceramic-body-liquid systems," *J. Biomed. Mat. Res.*, **29**,421-429 (1995)

[15] D.V. Kilpadi, G.N. Raikar, J. Liu, J.E. Lemons, Y. Vohra, J.C. Gregory, "Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: spectroscopic analyses," *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 646-659 (1997)

[16] C. Trépanier, M. Tabrizian, L'H Yahia, L. Bilodeau, D.L. Piron, "Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance," *J. Biomed. Mat. Res.*, **43**, 423-430 (1998)

[17] B. Demri, M. Hage-Ali, M. Moritz, D. Muster, "Surface characterization of C/Ti6Al4V coating treated with ion beam," *Biomaterials*, **18**, 305-10 (1997)

[18] T. Hanawa, K. Asami, K. Asaoka, "Repassivation and surface oxide film regenerated in similated bioloquid," *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 530-538 (1998)

[19] G.D. Davis, M. Natan, K.A. Anderson, "Study of titanium oxides using Auger lines shapes," *Appl. Surface Sci.*, **15**, 321-333 (1983)

[20] J.C. Keller, R.A. Draughn, J.P. Wightman, "Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **5**, 360 (1990)

[21] B. Wälivaara, B.O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, P. Tengvall, "Titanium with different oxides: *in vitro* studies of protein adsorption and contact activation," *Biomaterials*, **15** (10) (1994)

[22] R.E. Johnson, Jr., R.H. Dettre, "Wettability and contact angles," in *Surface and colloid science,* Vol.2, E. Matijevic (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 85-153 (1969)

[23] M. Taborelli, M. Jobin, P. Francois, P. Vaudraux, M. Tonetti, S. Szmukler-Moncler, J.P. Simpson, P. Descouts, "Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium," *Clin. Oral Impl. Res.*, **8**, 208-216 (1997)

[24] B. Kasemo, J. Lausmaa, "Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures," *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 145-158 (1988)

[25] R.E. Baier, A.E. Meyer, "Implant surface preparation," *Int. J. Oral. Maxillofac. Impl.*, **3**, 9-20 (1988)

[26] D.V. Kilpadi, J.E. Lemons, "Surface energy characterization of unalloyed titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 1419-1425 (1994)

[27] K.T. Bower, J.C. Keller, B.A. Randolph, D.G. Wick, C.M. Michaels, "Optimization of surface morphology for enhanced osteoblast responses in vivo," *Int. J. Oral Max. Impl.*, **7**, 302-310 (1992)

[28] D. Buser, R.K. Schenk, S.G. Steinemamn, J.P. Fiorellini, C.H. Fox, H. Stich, " Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs," *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 889-902 (1991)

[29] S. Dumitriu (editor), Blood-contacting polymers, Polymeric Biomaterials, Marcel Dekker, inc., pp. 349-366 (1994)

[30] C. Hehrlein, M. Zimmermann, J. Metz, W. Ensinger, W. Kübler, "Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents, "*Coronary Artery Disease*, **6** (7), 581-586 (1995)

[31] B.O. Aronsson, J. Lausmaa, B. Kasemo, "Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic Biomaterials," *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 49-73 (1997)

[32] M. Berget-Gorbet, B. Broxup, C. Rivard, L'H. Yahia, "Biocompatibiliy testing of NiTi screws using immunohistochemistry on sections containing metallic implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 243-248 (1996)

[33] F. Takeshita, H. Takata, Y. Ayukawa, T. Suetsugu, "Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol)," *Biomaterials*, **18** (1) (1997)

[34] J.-E. Sundgren, P. Bodö, I. Lundström, "Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel, ' *J. Colloid. Interface Sci.*, **110**, 9-20 (1996)

[35] D.J. Wever, A.G. Veldhuizen, J. de Vries, H.J. Busscher, D.R.A. Uges, J.R. van Horn, "Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy, " *Biomaterials*, **19**, 761-769 (1998)

[36] R.G. Vichev, Y. Liu, J. Van Humbeeck, B. Blanpain, J.P. Celis, "Thermally grown oxide films on NiTi shape memory alloys," Proceeding of the 7th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA), Göteborg, 1997

[37] D.V. Kilpadi, G.N. Raikar, J. Liu, J.E. Lemons, Y. Vohra, J.C. Gregory, "Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: spectroscopic analyses," *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 646-659 (1997)

[38] P. Filip, *Metallic Materials*, **32**, 1 (1994)

IV-3- Effets des traitements de surface et de la stérilisation sur la résistance à la corrosion du NiTi:

Article II

Effects of surface treatments and sterilization processes on the corrosion behaviour of NiTi shape memory alloy

Soumis pour publication dans: Journal of Biomedical Materials Research

Effect of surface treatment and sterilization processes on the corrosion behaviour of NiTi shape memory alloy

B. Thierry[1], *M. Tabrizian[1], C. Trépanier[3], O. Savadogo[2], L'H. Yahia[1]

[1] Biomedical Engineering Institute - Biomaterial/Biomechanics Research Group (BBRG), Mechanical Engineering Department, Ecole Polytechnique of Montreal, Montreal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montreal, Qc, H3C 3A7, Canada

[2] Physics and Materials Engineering Department, Ecole Polytechnique of Montreal, Montreal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montreal, Qc, H3C 3A7, Canada

[3] Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components, 47533 Westinghouse Drive, Fremont, CA, USA

* *Correspondence to :* Maryam Tabrizian, E-mail: tabrizia@grbb.polymtl.ca

ABSTRACT

NiTi alloy derives its biocompatibility and its good corrosion resistance from a homogeneous oxide layer, mainly composed of TiO_2, with very low concentration of nickel. In this paper, we described the corrosion behavior of NiTi alloys after mechanical polishing, electropolishing and sterilization processes using cyclic polarization and atomic absorption. As a preparative surface treatment, electropolishing decreased the amount of nickel on the surface and remarkably improved the corrosion behavior of the alloy by increasing the mean breakdown potential value and the reproducibility of the results (0.99±.05 V/SCE vs 0.53±.42). Ethylene oxide and Sterrad® sterilization techniques did not modify the corrosion resistance of electropolished NiTi while steam autoclave and, in a lesser extent, peracetic acid sterilization produced scattered breakdown potential. When comparing the corrosion resistance of common biomaterials, NiTi ranked between 316L stainless steel and Ti6Al4V even after sterilization. Electropolished NiTi and 316L stainless steel alloys released similar amount of nickel after a few days of immersion in Hank's solution. Measurements by atomic absorption have shown that the amount of released nickel from passive dissolution was below the expected toxic level in the human body. AES analyses indicated surface contamination by Ca and P on NiTi during immersion but no significant modifications in oxide thickness was observed.

Keywords: NiTi alloy, stents, electropolishing, sterilization techniques, corrosion behavior, ions release

INTRODUCTION

Nitinol has been investigated as an implant material since the beginning of the 80's. Its unique mechanical properties, namely thermal shape memory, superelasticity along with its good biocompatibility and corrosion resistance account for the alloy many applications in the biomedical field.[1] In the last years, one of the most popular application of NiTi alloy has been in the vascular field. Indeed, the thermoelastic properties of NiTi allow the design of new self-expanding stents for peripheral and coronary revascularisation interventions. In addition to its easier and more uniform deployment, NiTi has been reported to have a beneficial effect on haemocompatibility and neointimal formation associated to stent implantation.[2,3,4]

The biocompatibility of a metallic implant is strongly related to its resistance to corrosion processes. Many studies have reported that metallic implant alloys ions can be released in the body due to these processes. Since released metallic ions such as nickel may promote toxic, allergic and potentially carcinogenic effects, specific concerns have been raised relative to the corrosion behavior of nickel containing alloys such as NiTi and stainless steel. Bass *et al.* have reported conversion cases of nickel-nonsensitive subjects into nickel-sensitive subjects following the use of nickel-titanium arch-wires.[5] Similar nickel sensitivity reactions have been reported with stainless steel plates.[6] In addition, a subtoxic amount of metallic ions has been reported to affect the release of cytokines, which may be a concern for specific applications such as cardiovascular stents.[7,8] Corrosion reactions susceptible to occur with clinical use of metallic implants are numerous and can lead to different rates of ionic release: from low rates during passive dissolution to high rates when the breakdown of the protective oxide film occurs. Thus, the major risk associated with metallic implants is the breakdown of the passive film, taking place due to the aggressiveness of the physiological fluids and/or upon mechanical phenomenon such as wear and fretting.[9] This breakdown induces accelerated corrosion rates, leading to a high amount of ion dissolution in the body. Still, passive dissolution always arises during

clinical use and results in the release of small but consistent amount of metallic ions in the body.

Along with the promising results on the biocompatibility of NiTi alloy reported by many authors, several *in vitro* evaluations of corrosion properties of the alloy has been performed.[10,11,12] NiTi alloy derives its good corrosion behavior from a homogeneous oxide layer, mainly TiO_2 which spontaneously covers the surface of NiTi alloy in presence of oxygen. This passive surface layer, similar to those observed on titanium-based alloys, enhance NiTi high stability in most corrosive environments. Since the corrosion behavior is directly related to the surface properties, a well-controlled and reproducible surface is required prior to implantation. In a previous work, we have shown that electropolishing as a preparative treatment improves the corrosion resistance of NiTi stents.[12] Electropolishing removes the native oxide layer and induces the formation of a more uniform one.[13] These results were in accordance with those of Trigwell *et al.*, which demonstrated that electropolishing decreased both the amount of nickel on the surface of the alloy, as well as the corrosion current, therefore increasing NiTi biocompatibility[14]. Nevertheless, sterilization processes, as the final step in using any biomaterials in contact with the human body, have been shown to affect both surface finish[15,16] and corrosion resistance[17] of metallic devices. Shabalovskaya has previously reported the effects of some sterilization processes on NiTi.[18] Common sterilization processes include heat-based methods, chemical sterilization with agent such as ethylene oxide or liquid peracetic acid, and novel plasma - chemical phases sterilization techniques such as Sterrad® system.

The purpose of this work was to evaluate some of the corrosion processes that may occur on NiTi metallic devices, namely breakdown potential, repassivation and passive dissolution, and to determine whether surface processing such as electropolishing and sterilization may affect their behavior. To assess the effect of electropolishing on the surface properties of NiTi alloy as well as on its corrosion behavior, tests were performed

on NiTi discs mechanically polished prior to electropolishing. The topography and chemical composition of electropolished NiTi samples were analyzed by Atomic Force Microscopy (AFM) and Auger Electron Spectroscopy (AES) and compared to mechanically polished specimens. The corrosion behavior was determined by cyclic polarization assays in physiological solution, followed by atomic absorption analysis to evaluate the ion release and surface characterization with AES and Scanning Electron Microscopy (SEM).

MATERIALS

Nearly equi-atomic NiTi alloy was used for this study (Table IV-6). Twelve mm diameter discs were provided by Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components (Fremont, CA). All discs were first mechanically polished through a series of silicon carbide papers up to a 600-grit surface finish and then mirror-like finished using a 1-µm diamond paste. The NiTi discs were then divided in 6 different groups and processed as following: mechanically polished (MP), MP and then electropolished (EP), EP and sterilized by ethylene oxide (Steri Vac 5XL, one cycle) (EO), EP and steam autoclaved (Amsco 3043, one cycle) (SA), EP and sterilized with peracetic acid (Steris I, one cycle) (PA), and EP and sterilized by hydrogen peroxide plasma (Sterrad®-100S, one cycle) (PS). Mechanically polished stainless steel (316L) and titanium alloy (Ti6Al4V) discs were used as references.

To study the dissolution rate of nickel and chromium, NiTi and 316L stainless steel stents were used (Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components, Fremont, CA). The stents were 30 mm long electropolished slotted-tube devices with a mean surface area of 3.4 cm^2. Before the test, they were cleaned in soapy water, rinsed with methanol and air-dried.

TABLE IV-6

Composition of tested materials (wt%).

	Ni	Ti	Al	V	Cr	C	Mb	Fe
NiTi	55.8	balance	-	-	-	-	-	-
316L	12-14	-	-	-	17-20	< 0.03	2-4	balance
Ti6Al4V		balance	~6	~4	-	-	-	-

METHODS

Atomic Force Microscopy (AFM)

A Topometrix TMX 2010 AFM (Santa Clara, CA) was used to image the topography of the samples. Areas of 50 μm × 50 μm were scanned with Si_3N_4 tips. MP and EP samples (n=3 for each groups) were analyzed at four random locations in contact (repulsive) mode. Roughness analyses were performed to determine the average Roughness (R_a).

Auger Electron Spectroscopy

Auger Electron Spectroscopy analyses were performed using a JAMP-30 Auger system (JEOL, Tokyo, Japan) in derivative mode at 10 keV with an electron beam current of 0.5 μA. Depth profiles (0-500 nm) were measured by combining AES spectra analyses and ion sputter etching. The oxide layer (in units of times) was estimated by measuring the width of the peak-to-peak oxygen signal at one half of its maximum value. The thickness in terms of sputtering time was converted to depth units in nanometers using the sputtering rate calibrated for SiO_2. Relative concentrations (in atomic percentage) of the detected elements were calculated from their peak-to-peak values in differential AES

spectra. The correction of these values with tabulated elemental sensitivity factors[19] and experimental measurements from AES spectra of the bulk material was also performed.

Potentiodynamic tests:

Cyclic polarization assays were undertaken in Hank's physiological solution on a computer-controlled potentiostat (EG&G Princeton Applied Research, model 273). The electrolyte solution was of the following composition: 8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.35 g/L $NaHCO_3$, 0.006 g/L KH_2PO_4, 0.0475 g/L Na_2HPO_4, 1 g/L glucose, 3.57 g/L HEPES. During the assays, the electrolyte was deaerated by bubbling with nitrogen gas and maintained at a constant temperature of 40°C. A standard three-electrode system was used: a platinum grid as counter electrode and a saturated calomel electrode (SCE) as a reference (all potentials are expressed with respect to this electrode).

The measurements were carried out after 60 min immersion in the electrolyte solution while the open circuit potential (ocp) was recorded. The potential scan was started at a 250 mV more cathodic potential than the ocp, increasing toward the anodic values at a constant rate of 0.17 mV/min up to 1400 mV/SCE and then a reverse scan was carried out toward the cathodic value.

The corrosion behavior of the discs was characterized by the breakdown potential, E_B and protection potential, E_p. The difference between the breakdown and protection potential is related to the pitting corrosion resistance of the material. The lower the difference, the more corrosion resistant the material is. The corrosion current density, I_{corr}, measured by using Tafel extrapolation was related to the corrosion rate (ASTM-G102-89)[20]. The corrosion current was estimated by extrapolating the linear portions of the potentiodynamic curve near the rest potential. From these values, the Mass loss Rates (MR) were calculated applying Faraday's law.

Ion Release Analyses

Electropolished NiTi and stainless steel stents were used to characterize Ni and Cr ion release in Hank's physiological solution. The specimens were immersed and gently agitated in 40 mL Hank's solution maintained at 38°C. After specific periods of time (day=1, 3, 9, 17), the solution was collected and stored prior to analysis. The flasks were then refilled with fresh Hank's solution to avoid saturation effects during the assays and compared with the reference. Analysis of the ions released in the solution was performed using a HGA-500 graphite furnace atomic absorption (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL). The Ni and Cr resolutions were respectively 0.5 μg/L and 0.2 μg/L.

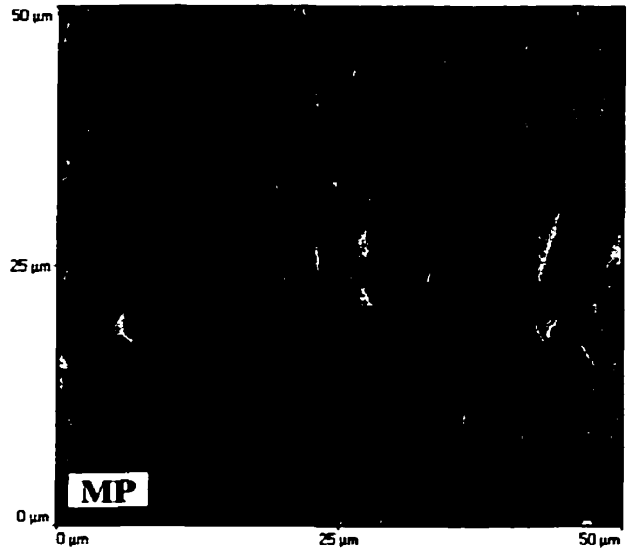
Results were analyzed using Student-T-test and $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Effect of electropolishing on surface characteristics and corrosion behavior

AFM analyses revealed that electropolished disc surfaces were similar in roughness to mechanically polished (Ra~8 nm for EP group vs. 6 nm for MP group). Nevertheless, the topography of each group appeared different on AFM pictures (Fig. IV-7). In general, the mechanically polished sample surfaces were smooth but eroded while electropolished specimens surfaces were more uniform. Using AES, we were able to investigate the surface chemistry of NiTi and stainless steel alloys. Spectra analyses indicated the composition of the NiTi surfaces, i.e. mainly titanium (~ 418 eV), nickel (~ 848 eV), and oxygen (~ 510 eV). The main surface contamination was carbon (~ 272 eV). As shown in figure IV-8, the amount of titanium and nickel on the surface was significantly modified

by electropolishing in comparison to mechanical polishing ($p < 0.05$). Indeed, the nickel concentration decreased from 11.5% to 1% after electropolishing while the superficial ratio of titanium versus nickel increased from 0.9 for controls to 15. The typical AES depth profile indicated similar oxide layer thickness (~ 4 nm) for electropolished and mechanically polished samples. However, electropolished NiTi surfaces were found to be enriched in titanium at the first mono layer of the surface. Analyses of electropolished stainless steel revealed that the surface was covered by a chromium and iron rich oxide layer, with small amount of nickel. While iron concentration steadily increased until a constant value, the amount of chromium was maximum in the most outer layer of the surface and decreased to a minimum corresponding to a maximum concentration of nickel. The oxide thickness averaged 2 nm.



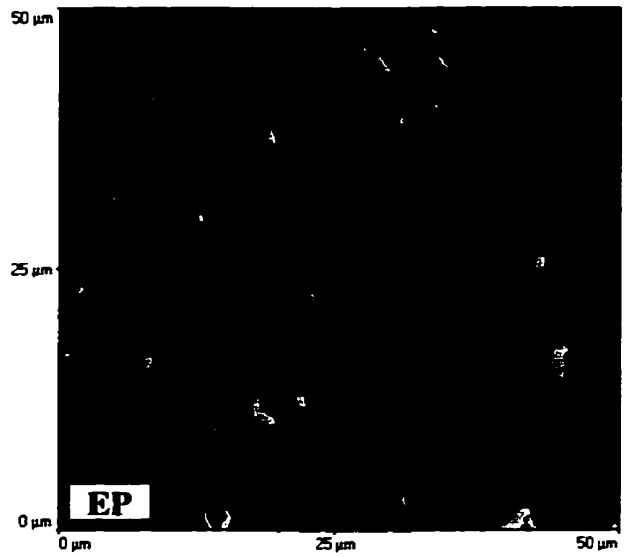


Figure IV-7. Typical AFM images of mechanically polished and electropolished NiTi discs.

Figure IV-9. presents the cyclic polarization curves for mechanically polished (MP) and electropolished (EP) NiTi specimens, stainless steel and Ti6Al4V. These curves represent the lowest E_B recorded for each alloy. The corrosion parameters extracted from all the corrosion assays are summarized in the table II. The EP NiTi samples(n= 8) presented breakdown potentials in the range of 1 V/SCE, which is significantly higher than the wide range results obtained for the MP (between 0.1 to 0.9 V/SCE). On EP NiTi samples, no trace of localized corrosion was observed. Hence, it was difficult to define the protection potential for EP samples. The protection potential averaged around -0.25 V/SCE for MP NiTi specimens. The corrosion current was decreased by electropolishing (0.68 nA) in comparison to the mechanically polished discs (18.12 nA). The estimated Mass loss Rates (MR) were reduced from 114 mg/m^2d to 4.3 mg/m^2d.

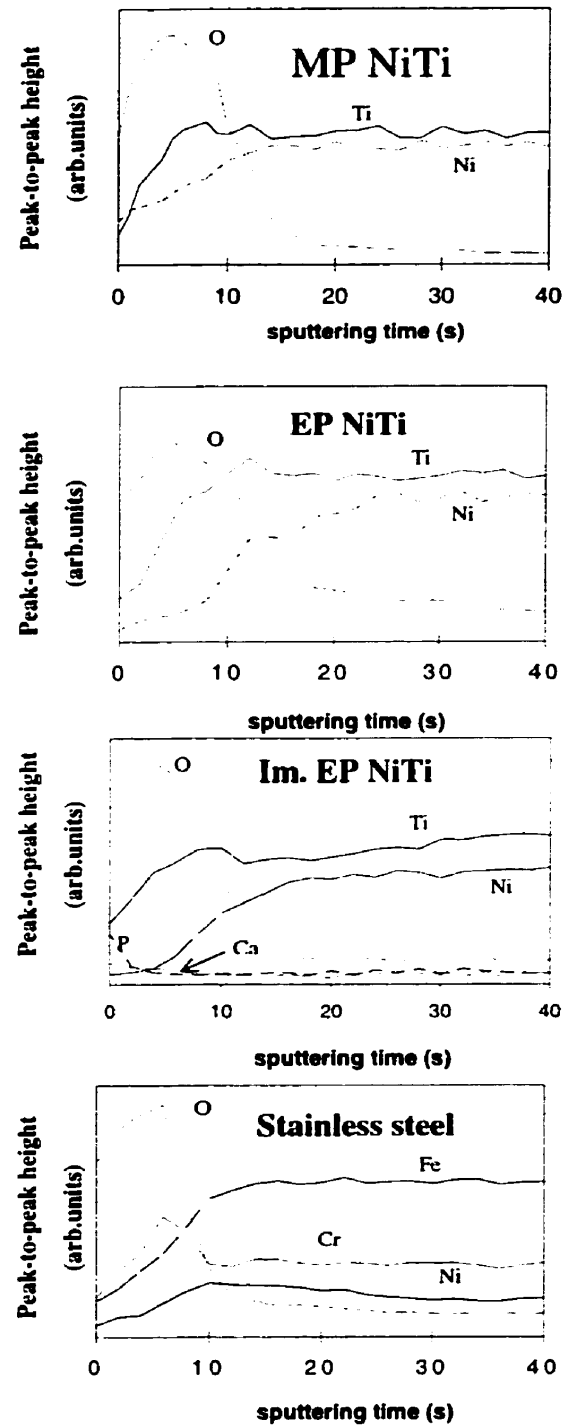


Figure IV-8. Typical AES depth profile of mechanically polished NiTi (MP), electropolished NiTi (EP NiTi), electropolished NiTi after immersion in Hank's solution for 21 days at 38°C (Im. EP NiTi), and electropolished stainless steel.

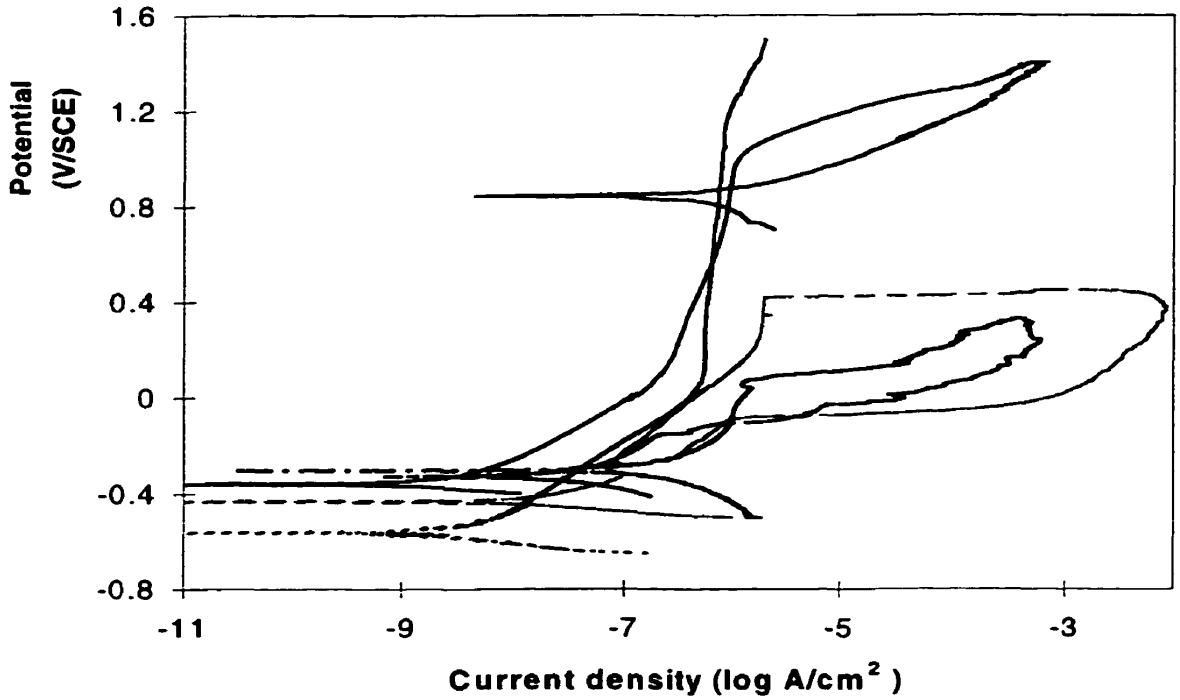


Figure IV-9. Cyclic polarization curves in Hank's solution of electropolished NiTi discs in comparison to that of mechanically polished NiTi, stainless steel (316L) and titanium alloy (Ti6Al4V).

The titanium alloy (n= 3) (Ti6Al4V) did not breakdown in the applied potential range, indicating a breakdown potential superior to 1.4 mV (Fig. IV-9). Stainless steel (316L) polarization curves clearly indicated a breakdown potential near 0.4 V/SCE (n= 3) and a repassivation potential in the range of -0.300 V/SCE.

Effect of sterilization processes on electropolished NiTi

Figure IV-10. presents the cyclic polarization curves for electropolished NiTi (EP), and sterilized NiTi (SA, EO, PS, PA, n= 5). Again, each curve represents the lowest pitting potential recorded for each group. Among the investigated sterilization techniques, ethylene oxide and Sterrad® did not modify the corrosion properties of the alloy based on cyclic polarization (1.07 ± 0.04 V/SCE for EO and 1.02 ± 0.04 V/SCE for PS vs 0.99 ± 0.05 V/SCE for EP NiTi). Specimens sterilized by steam autoclave (0.86±0.2 V/SCE) and in a lesser extent those processed by peracetic acid (0.93 ± 0.13 V/SCE) presented scattered values of breakdown potential and localized corrosion that was confirmed by visual observation on some samples (2 for SA, one for PA). Still, there was no significant difference between both SA and PA and the EP NiTi groups ($p > 0.05$). Based on the corrosion current, estimation of the corrosion rate was performed for all samples (ASTM-G102-89). No significant differences were detected among sterilized surfaces. The estimated averaged corrosion rate was ~ 6-12 $.10^{-7}$ $\mu g/cm^2/s$.

TABLE IV-7

Breakdown potential (E_B) and repassivation potential (E_p) from cyclic polarization assays in hank's solution.

	MP	EP	SA	EO	PA	PS	316L	Ti6Al4V
E_B (V/SCE)	0.53±.42	0.99±.05	0.86±.2	1.07±.04	0.93±.13	1.02±.04	0.41±.05	> 1.4
E_p (V/SCE)	~ -0.250	-	~ -0.250	-	-	-	~ -0.300	-

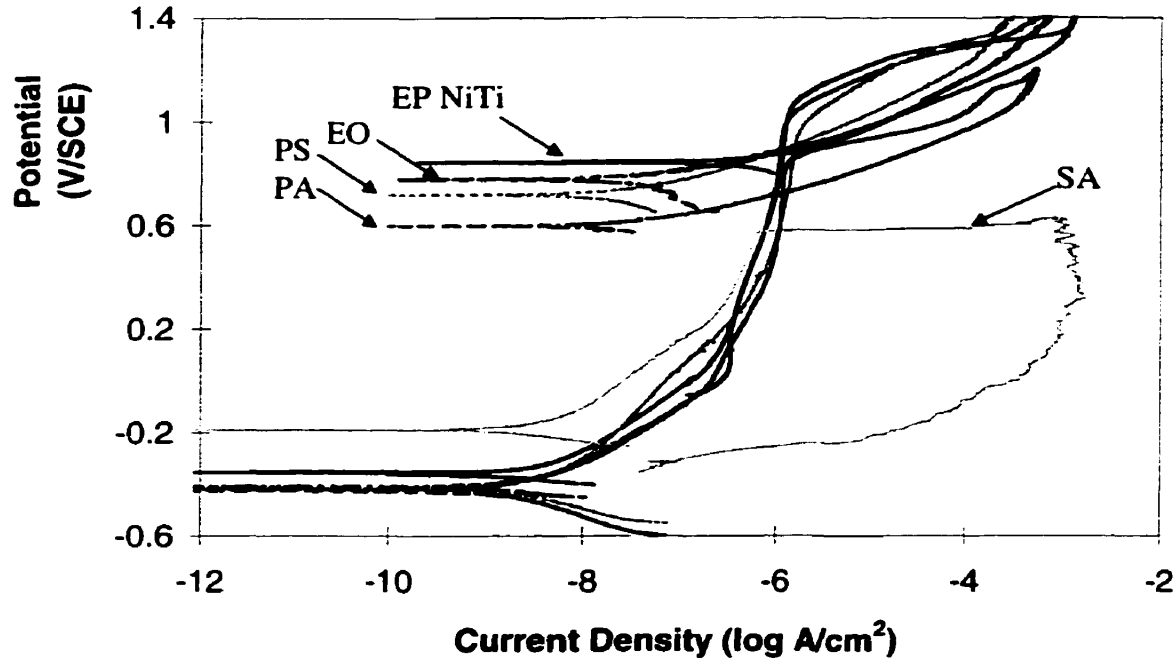


Figure IV-10. Cyclic polarization curves in Hank's solution of sterilized NiTi discs in comparison to that of electropolished NiTi (EP NiTi).

Ions release analyses

The negative control (pure Hank's solution) contained 0.5 µg/L of nickel and 0.2 µg/L chrome. The ionic release rates from each group are presented in Figure IV-11 (cumulative and differential concentrations). It is important to note that the measured rate is a mean value averaged for 24h of immersion and that we only measured the release of nickel and chromium. Stainless steel presented an initial release of chrome (0.8 10^{-8} µg/cm^2/s) but the rate fell under the detection limit after 3 days. The dissolution rate was well correlated for nickel with a logarithmic rule ($r^2 \sim 0.9$) for both electropolished NiTi and stainless steel.

The SEM inspection of the stents after 21 days of immersion in Hank's solution at 38 °C did not show the presence of corrosion such as pitting. Prior to immersion, EP NiTi AES spectra indicated that the main surface composition was oxygen and titanium with a small amount of carbon as contaminant. After immersion, in addition to oxygen and titanium, small concentrations of phosphorus and calcium were detected on the surface. The AES depth profile indicated that these contaminants were only on the outer layer of the surface (Fig. IV-8). The oxide thickness averaged 4 nm prior and after immersion in Hank's solution.

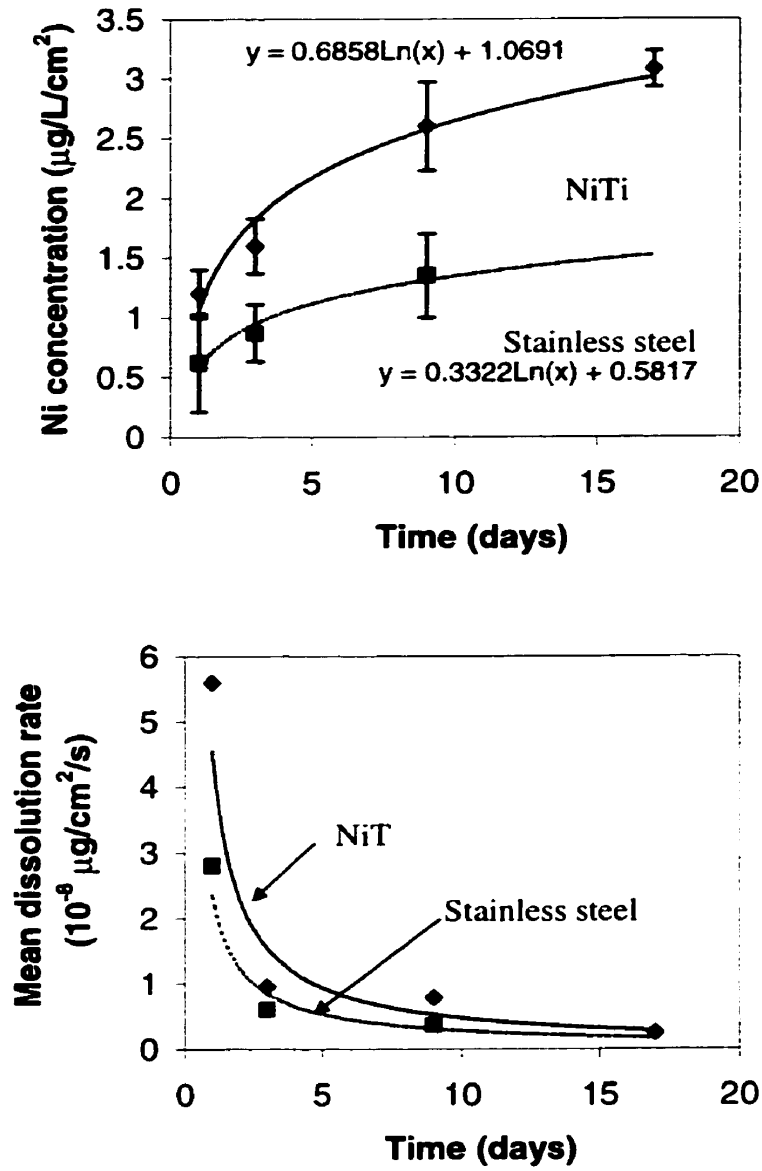


Figure IV-11. Determination of nickel ions release rate from electropolished NiTi and stainless steel stents in Hank's solution as a function of time of immersion as measured by Atomic absorption.

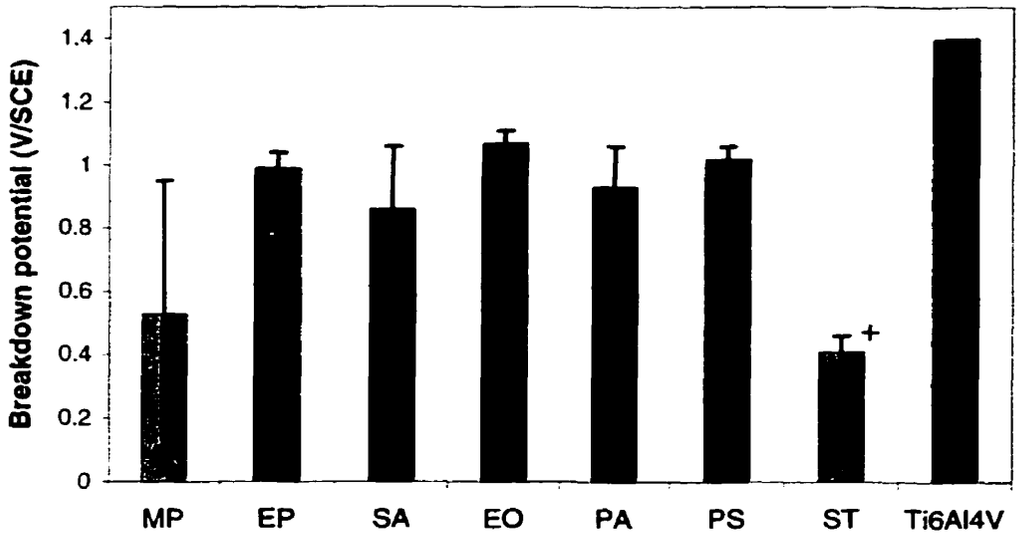


Figure IV-12. Breakdown potential from cyclic polarization assays in Hank's solution. Data represent mean value ± standard deviation; * significant vs. Stainless steel, + significant vs. Ti6Al4V ($p < 0.05$)

DISCUSSION

The aim of this study was to characterize the effect of electropolishing as a final surface treatment for NiTi alloy on surface properties and corrosion behavior, and to assess the effect of sterilization techniques after such treatment. When considering our results, it is important keep in mind that toxicity and elimination kinetics of corrosion-released ions are highly dependent on numerous factors such as the chemical nature, concentration and oxidation state.[21,22] Hence, it is very difficult to predict the potential toxic and allergic effects of metallic alloys from *in vitro* experiments, even though they have been widely

studied, particularly for orthopedic or dental alloys containing nickel, chromium, cobalt, etc.

Surface characterization has shown that electropolishing can modify the surface chemical composition, the topography and the resistance to corrosion processes of mechanically polished NiTi alloy. NiTi alloy tends to be naturally covered by a protective TiO_2 layer similar to that observed on titanium alloys. Electropolishing removed the surface oxide layer plastically deformed on the polycrystalline bulk material during polishing and promoted the growth of a new one almost free of nickel.[12,23] This titanium rich oxide layer is at the origin of the improvement in corrosion resistance observed in our study for EP NiTi. Indeed, surface characteristics play a key-role in the corrosion resistance of metallic implant. The contradictory results for mechanically polished samples reported by many authors are in agreement with the wide variability of corrosion resistance obtained for our mechanically polished samples. These results can be attributed to the variability of the protective oxide layer on NiTi where grain boundaries, defects and surface stress act as initiator sites for localized corrosion.[24,25] By opposition to the mechanically polished samples who presented scattered breakdown potential, electropolished samples tended towards higher and reproducible breakdown potentials values (0.99 ± 0.05 V/SCE). In addition, despite increasing clinical experience with NiTi implants, there is no evidences of *in vivo* breakdown of the passive film during its implantation.

The random localized corrosion during cyclic polarization observed on some sterilized samples may be due to weakening of the protective oxide layer. The sterilization by steam autoclave or peracetic acid may have created some surface defects leading to localized corrosion. Our previous study has shown that such sterilization processes are able to modify the surface topography, energy, and in a lesser extent, chemical composition of NiTi alloy.[15] Despite the use of boiler water additives to decrease the corrosive nature of steam, corrosion phenomena were previously reported on stainless steel after such sterilization techniques.[26] However, other parameters, mainly unappropriate processing or

manipulation of the samples during and after sterilization cannot be excluded. The limited number of tested specimen (n= 5) did not allow us to conclude definitively on these results. Still, when compared with common metallic biomaterials, EP NiTi alloy ranked between stainless steel (316L) and titanium alloy (Ti6Al4V) sterilized or not. It is likely that electropolishing may reduce the effects of sterilization processes on both surface properties and corrosion resistance. Similar result has been reported on passivated unalloyed titanium by Kilpadi et *al.*[27] Based on polarization curves of damaged specimens (SA and PA samples), the repassivation potential of NiTi alloy was estimated to be about -0.250 V/SCE, which is in accordance with previously reported data.[28] Up to date, only the repassivation potential of the alloy has been characterized[24] and further studies are required to determine the kinetics of the processes.

The potential release of nickel from the surface during passive dissolution is another important concern in biocompatibility of NiTi alloy. Again, the low nickel dissolution rate from EP NiTi demonstrated the protective effect of the titanium rich oxide layer enhanced by electropolishing. On the other hand, stainless steel surface was essentially covered by a chromium and iron rich oxide layer, and only small amount of nickel was observed with AES analysis in the outermost layer of the surface.[29] Low chromium ion release was initially detected for stainless steel specimens. As illustrated in the differential curve (Fig. IV-11), EP NiTi alloy initially released higher amount of nickel in comparison to EP 316L. After less than 21 days, the nickel release tends to value below the detection limits for both NiTi and 316L. Since the amount of nickel in NiTi (~55%) is almost 4 times greater than in 316L (~13%), the nickel dissolution rates (3.08 10^{-8} $\mu g/cm^2/s$ for NiTi vs 1.80 10^{-8} $\mu g/cm^2/s$ for 316L) were not related to the amount of nickel in the bulk alloy. It is more likely to be modulated by the nickel amount on the surface of each alloy. Furthermore, when compared with previous work on the dissolution of nickel from NiTi with various surface treatments, our results seemed to indicate superior resistance of EP NiTi to nickel dissolution in comparison to passivated NiTi.[10] NiTi and stainless steel dissolution rates measured in our study are expected to be far under the cytotoxic or

carcinogenic level reported for this ion.[11,30] The average nickel dietary intake is about 160-900 μg/day which is almost 1000 fold higher than the measured dissolution rates.[31] Nevertheless, few amounts (~ 1%) of nickel from food is adsorbed in the body.[32] However, nickel released in soft tissue from metallic implant is likely to be bound to blood plasma protein such as albumin, transported, and only gradually excreted in urine or processed metabolically.[33] Therefore, it can be assumed that nickel (and chromium) passive dissolution from electropolished stents is safe and will not lead to systemic nor local adverse reactions. Still, local increase of the ionic concentration in the surrounding tissue of the prosthesis should not be excluded for both NiTi and stainless steel especially as the rate of ionic release can be dramatically increased by galvanic or mechanically assisted corrosion of such passivating alloys. Indeed, wear, fretting or galvanic corrosion which may occur in demanding applications such as orthopedics and disrupt the protective oxide film, significantly increases the risk of corrosion.[34] In the particular case of endoluminal stents, specific concern should be raised on the conjoint use of 2 or more devices. Despite the recent report on low galvanic corrosion current in such case[35], fretting and galvanic corrosion are likely to occur, which may in turn increase the inflammatory response commonly associated to stent implantations.[7]

Contradictory results have been reported on the growth of oxide surface layer *in vitro* as well as *in vivo* simultaneously to the passive dissolution.[36] Our study showed that immersion in Hank's solution for 21 days did not modify the thickness of oxide layer that averaged 4 nm prior to immersion. Even though the selective nickel dissolution during corrosion processes is expected to increase the Ti/Ni ratio on the surface, the small amount of nickel on EP NiTi which was at the limit of the detection level of AES analyses, did not allow us to observe such phenomena. The low concentration of phosphorus and calcium detected on the Hank's immersed surfaces are common features for titanium alloy and NiTi *in vitro* as well as *in vivo*.[10] AES depth profile indicated that these contaminants were only on the outer layer of the surface. In fact, Hanawa *et al.* have

previously suggested that calcium phosphate films may contribute to the good biocompatibility of such metallic alloys.[37]

CONCLUSIONS

Due to their appealing mechanical properties, NiTi alloys have gained in popularity in the biomedical field. The very promising corrosion behavior of the alloy enhanced by electropolishing, i.e. high and reproducible breakdown potential along with low dissolution rate in physiological solution, as shown in our study, promote its application as long-term implants. This study has shown that the improvement of the corrosion resistance is due to the modification of surface characteristics by the electropolishing process. Our AES and AFM studies pointed out that electropolishing creates a very homogeneous and smooth surface oxide layer almost free of nickel. Furthermore, electropolishing may protect the surface from other processing. As observed in our study, sterilization did not affect adversely the corrosion resistance of EP NiTi. Despite some changes in surface characteristics induced by sterilization that may weaken the passive film, the corrosion resistance of sterilized electropolished samples remained in the same range as electropolished samples and higher than stainless steel.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly supported by NSERC. We thank Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components (Fremont, CA) for their technical and financial support; Mr. Gerard Guerrin and Ms. Carole Massicotte for their skillful technical assistance. We also wish to thank St-Eustache and Charles Lemoyne Hospitals for sterilization processes.

References

[1] W. V. Moorleghem, M. Chandrasekaran, D. Reynaerts, J. Peirs, H. V. Brussel, "Shape memory and superelastic alloys: The new medical materials with growing demand," *Biomed. Mater. Res.*, **8**, 55-60 (1998)

[2] B. Thierry, Y. Merhi, C. Trepanier, L. Bilodeau, L'H. Yahia, M. Tabrizian, "Nitinol stents versus stainless steel: Thrombogenicity study using an ex vivo model," (under press)

[3] S. Sheth, F. Litvack, V. Dev, M. C. Fishbein, J. S. Forrester, N. Eigler, "Subacute thrombosis and vascular injury resulting from slotted-tube Nitinol and stainless steel stents in a rabbit carotid artery model," *Circulation*, **94**, 1733-1740 (1996)

[4] A. J. Carter, D. Scott, J. R. Laird, L. Bailey, J. A. Kovach, T. G. Hoopes *et al.*, "Progressive vascular remodeling and reduced neointimal formation after placement of a thermoelastic self-expanding Nitinol stent in an experimental model," *Cathet. Cardiovasc. Diagn.*, **44**, 193-201 (1998)

[5] J. K. Bass, H. Fine, G. J. Cisnero, "Nickel hypersensitivity in the prothodontics patient," *Am. J. Dentofacial. Orthop.*, **103**, 280-285 (1993)

[6] M. Cramers, L. Lucht, "Metal sensitivity in patients treated for tibial fractures with plates of stainless steel," *Acta Orthop. Scand.*, **48**, 245-249 (1977)

[7] J. C. Wataha, P. E. Lockwood, M. Marek, M. Ghazi, "Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro," *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 251-257 (1999)

[8] J. Y. Wang, B. H. Wicklund, R. B. Gustilo, D. T. Tsukayama, "Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokynes by human monocytes/macrophages in vitro," *Biomaterials*, **17**, 2233-2240 (1996)

[9] J. J. Jacobs, A. K. Skipor, L. M. Patterson, N. J. Hallab, W. G. Paprosky, J. Black, "Metal release in patient who have had a primary total hip arthroplasty," *J. Bone Joint Surg.*, **80A**(10), 1447-1458 (1998)

[10] D. J. Wever, A. G. Veldhuizen, J. de Vries, H. J. Busscher, D. R. A. Uges, J. R. van Horn, "Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy," *Biomaterials*, **19**, 761-769 (1998)

[11] J. Ryhanen, E. Niemi, W. Serlo, E. Niemela, P. Sandvik, H. Pernu, T. Salo, "Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures," *J. Biomed. Mater. Res.*, **35**, 451-457 (1997)

[12] C. Trepanier, M. Tabrizian, L'H. Yahia, L. Bilodeau, D. L. Piron, "Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance," *J. Biomed. Mat. Res.*, **43**, 423-430 (1998)

[13] Annual Book of ASTM Standards, Vol. 13.01. Philadelphia, PA: ASTM;1996: Section 13

[14] S. Trigwell, G. Selvaduray, "Effects of surface finish on the corrosion of NiTi alloy for biomedical application," Proceeding of the International Conference on Shape Memory and Superelasticity, 383-388, Pacific Grove, California, USA (1996)

---

[15] B. Thierry, M. Tabrizian, O. Savadogo, L'H. Yahia, "Effects of sterilization processes on NiTi alloy - Surface characterization," *J. Biomed. Mat. Res.*, (in press)

[16] P. J. Vezeau, G. F. Koorbusch, R. A. Draughn, J. C. Keller, "Effects of multiple sterilization on surface characteristics and *in vitro* biologic responses to titanium," *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **54**, 738-746 (1996)

[17] R. W. Revie, N. D. Greene, "Corrosion behaviour of surgical implant materials: I. Effects of sterilization," *Corrosion science*, **9**, 755-762 (1969)

[18] S. A. Shabalovskaya, "On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys," *Biomed. Mater. Eng.*, **6**, 267-289 (1996)

[19] L. E. Davis, N. C. MacDonald, P. W. Palmberg, G. E. Riach, R. E. Weber, Handbook of Auger Electron spectroscopy, Physical Electronics, Eden

[20] Annual Book of ASTM Standards, Vol. 13.02. Philadelphia, PA: ASTM;1996: Section 1-6

[21] S. A. Brown, L. J. Farnsworth, K. Merrit, T. D. Crowe, "*In vitro* and *in vivo* metal ion release," *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 321-338 (1988)

[22] A. R. Oller, M. Costa, G. Oberdorster, "Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 152-166 (1997)

---

[23] B. Wälivaara, B. O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, P. Tengvall, "Titanium with different oxides: *in vitro* studies of protein adsorption and contact activation," *Biomaterials*, **15** (10), 827-834 (1994)

[24] G. Rondelli, B. Vicentini, "Localized corrosion behaviour in simulated human body fluids of commercial Ni-Ti orthodontic wires," *Biomaterials*, **20**, 785-792 (1999)

[25] Y. Nakayama, "In vivo measurement of anodic polarization of orthopaedic implant alloys: comparative study of in vivo and in vitro experiments," *Biomaterials*, **10**, 420-424 (1989)

[26] F. Custer, L. Addington, "Physical changes of instruments during sterilization," (1964)

[27] D. V. Kilapdi, G. N. Raikar, J. Liu, J. E. Lemons, Y. Vohra, J. C. "Gregory. Effects of surface treatment on unalloyed titanium implants : Spectroscopic analyses," *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 646-659 (1998)

[28] X. X. Wang, L. C. Zhao, W. Chai, "Corrosion characteristics of Ti-Ni shape-memory alloys in saline solution," Proceeding of the International Conference on Shape Memory and Superelasticity, 379-382, Pacific Grove, California, USA (1996)

[29] J. -E. Sundgren, P. Bodo, I. Lundstrom, A. Berggren, S. Hellem, "Auger electron spectroscopic studies of stainless steel implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 663-671 (1985)

[30] W. Jia, M. W. Beatty, R. A. Reinhardt, T. M. Petro, D. M. Cohen, M. Hoffman *et al.*, "Nickel release from orthodontic arch wires and cellular immune response to various nickel concentration," *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, **48**, 488-495 (1999)

---

[31] M. A. Flyvholm, G. D. Nielsen, A. Andersen, "Nickel content of blood and estimation of dietary intake," *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **179**, 427-431 (1984)

[32] F. W. Sunderman, S. M. Hopfer, K. R. Sweeny, A. H. Marcus, B. M. Most, J. Creason, "Nickel absorption and kinetics in human volonteers," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **191**, 5-11 (1989)

[33] K. Merrit, S. A. Brown, "Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions," *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, **329S**, S233-S243 (1996)

[34] J. L. Gilbert, L. Zarka, E. Chang, C. H. Thomas, "The reduction half cell in biomaterials corrosion: oxygen diffusion profiles near and cell response to polarized titanium surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, **42(2)**, 321-30 (1998)

[35] M. Shin, "In vitro galvanic corrosion testing of tantalum, nitinol, and type 316L stainless steel stents," Society For Biomaterials, 25th annual meeting transactions, April 28-May 2, Providence, 479 (1999)

[36] M. Esposito, J. Lausmaa, J.-M. Hirsch, P. Thomsen, "Surface analyses of failed oral titanium implants," *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, **48**, 559-568 (1999)

[37] T. Hanawa, M. Oda, "Calcium phosphates naturally formed on titanium in electrolyte solution," *Biomaterials*, **12**, 767-774 (1991)

IV-4- Thrombogénicité de stents cardiovasculaires en NiTi:

Article III

Effects of surface modifications induced by sterilization on the thrombogenicity of nickel titanium stents

Publication dans : «Shape Memory Implants», Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – Tokyo.

Effects of surface modification induced by sterilization processes on the thrombogenicity of nickel-titanium stents

B. Thierry[1], *M. Tabrizian[1], Y. Merhi[2], L. Bilodeau[2], O. Savadogo[3], L'H. Yahia[1]

[1] Biomedical Engineering Institute - Biomaterial/Biomechanics Research Group (BBRG), Mechanical Engineering Department, Ecole Polytechnique of Montréal, Montréal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montréal, Quebec, Canada, H3C 3A7

[2] Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montréal, Québec, Canada, H1T 1C8

[3] Physics and materials department, Ecole Polytechnique of Montreal, Montreal, C.P. 6079, Succ. "Centre ville", Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

* *Correspondence to :* Maryam Tabrizian, tabrizia@grbb.polymtl.ca

Key-words: NiTi stents, sterilization processes, thrombogenicity, platelets adhesion, ex vivo model, shear stress

INTRODUCTION

Based on promising reports from international randomized trials such as BENESTENT, vascular stent implantation has been increasingly used – with more than 500,000 implantations per year worldwide - and has become a procedure of choice in the treatment of atherosclerotic vascular disease[1,2]. Since the first implantation in 1986, many devices, mostly balloon expandable stainless steel stents, have been approved by regulatory agencies, namely FDA, HPB and CEE for both peripheral and coronary revascularization. In the early 90's, many studies have reported experimental temporary or permanent use of NiTi stents[3,4]. Due to the thermoelastic properties of the alloy, optimal deployment of NiTi self expanding stents can be easily achieved with high expansion ratio and less longitudinal shortening than most common stainless steel devices. In addition, their flexibility and radiopacity along with their good biocompatibility and resistance to corrosion have contributed to their increasing use in cardiovascular applications[5,6,7]. Despite its good biocompatibility, like all metallic materials NiTi is prone to adsorption of plasma protein such as fibrinogen which is a potent promoter of platelet adhesion[8]. In a recent study, Makkar *et al.* have shown that surface topography significantly affects the thrombogenicity of NiTi stents, which may in turn have an effect on complications observed after implantation[9]. Indeed, platelets adhesion is the first step of thrombus formation which may lead to acute and subacute thrombosis. Stent thrombosis still represents a major complication after stent implantation, especially for small vessels, thrombus containing lesions and bifurcation stenoses[10]. Moreover, through the release of growth factor by activated platelets, thrombus formation are expected to participate to the restenosis process initiation[11]. Thus, many strategies have been developed to reduce stents thrombogenicity such as improvement of surface characteristics or coating with pharmacological drugs and polymers[9,12,13].

The measurement of surface-adsorbed plasma proteins such as fibrinogen and of surface-adhering cells such as platelets in *ex vivo* arterioveneous shunt models have been widely used to study the thrombogenicity of different materials and designs[14]. These studies suggest that many parameters are involved in the thrombogenicity of a stent. Among all, the design seems to be very important[15]. However, the nature, i.e. the chemical composition of the alloy and the surface properties of the material, have a prominent effect on the thrombogenicity of a stent[6,16]. The cellular interactions between any biomaterial and blood are modulated by several parameters such as the chemical composition, the surface energy, topography, and potential. These factors are strongly related together, and it is very difficult to find out which one has the strongest effect on the host plasma protein layer adhering on implants surface in contact with blood and thus, the cellular response.

Sterilization has been demonstrated to modify the topography and the chemical properties of the surface as well as the biocompatibility of metallic biomaterials such as NiTi[17,18]. Consequently, the effects of sterilization must be well characterized before using materials which will be in contact with blood. Conversely, depending on the flow condition, contradictory results have been reported on the relative thrombogenicity of NiTi and stainless steel[6,19,20]. This is not surprising since thrombus formation *in vivo* is a dynamic phenomenon highly dependent on various parameters and among these the wall shear stress is of primary importance. On one hand, increasing blood flow increases the number of circulating platelets and thus enhances thrombus formation, and on the other hand, it also increases shearing force capable of fragmenting thrombogenic material[21]. The wall shear stresses tested in this study are representative of those encountered *in vivo* in medium size arteries through reproduction of coronary blood flow in properly sized AV shunt tubing.

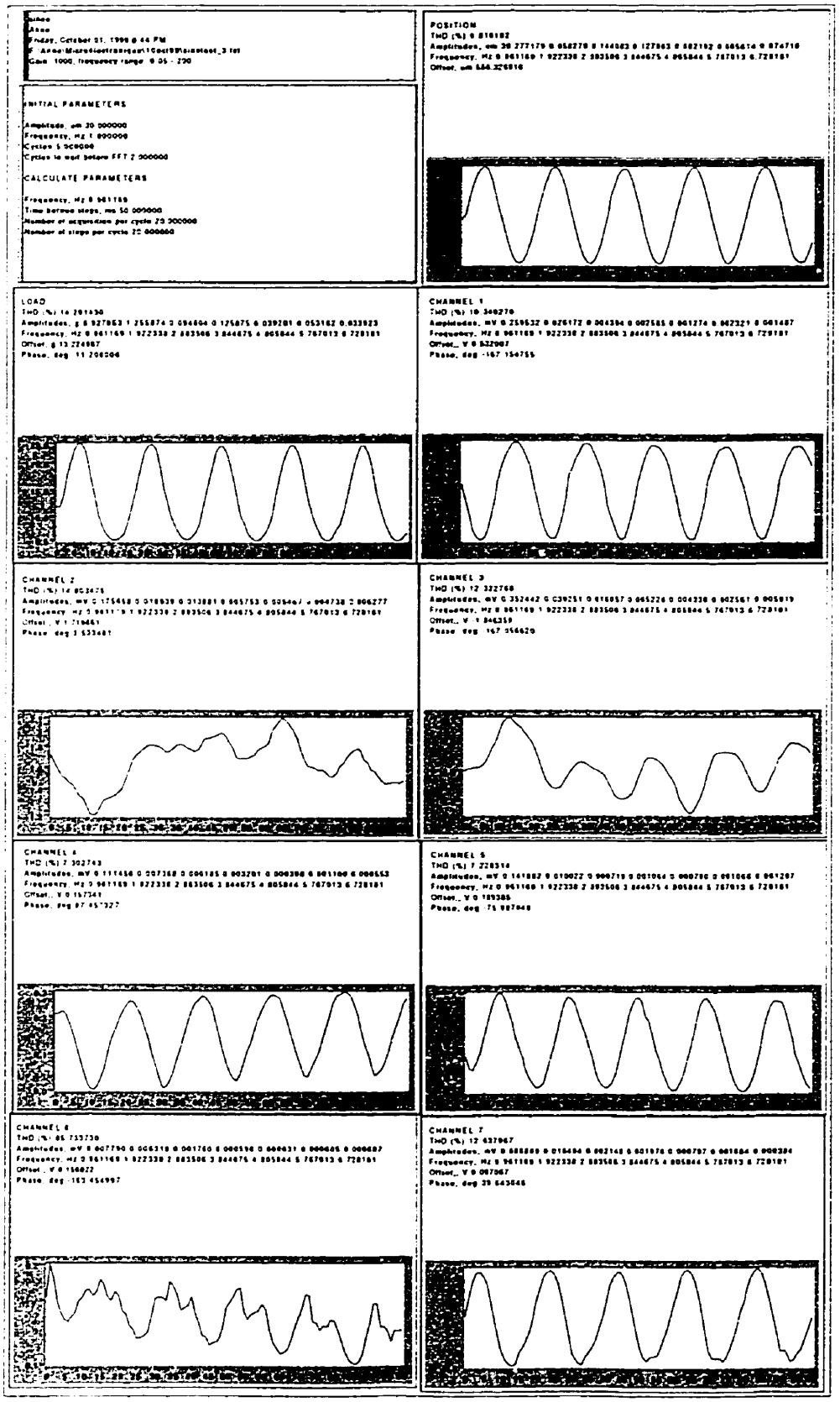
There is an obvious lack of data regarding such interactions between flow conditions, surface properties and composition, especially for new biomaterials such as NiTi. The

aim of this work was therefore to evaluate these points in an *ex-vivo* AV shunt porcine model which was constituted with a multichannel perfusion chamber and under physiological conditions. First, the relative thrombogenicity of NiTi stents following various sterilization processes, namely steam autoclave, ethylene oxide, Sterrad® and liquid peracetic acid sterilization were compared. Second, a comparison between thrombogenicity of NiTi and stainless steel stents of identical design was achieved under physiological flow conditions (wall shear rate of 228 and 456 sec^{-1}). The chemical composition and the topography of NiTi and stainless steel stents were characterized using AES and SEM to achieve a better comprehension of these phenomena.

MATERIALS

The stents were 3 mm diameter and 30 mm-long slotted-tube geometry devices (Fig. IV-13) that were laser cut from NiTi tubing (Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components, USA) to duplicate commercially available Palmaz stents design (P294M, J&J, Cordis Corporation, USA). They were processed, electropolished and cleaned according to standard process for metallic biomaterials (Table IV-8). The NiTi stents were divided in five groups (n= 7) and sterilized one cycle under clinical conditions by steam autoclave (SA) (Amsco 3043), ethylene oxide (EO) (Steri Vac 5XL), hydrogen peroxide plasma (PS) (Sterrad®-100S), and peracetic acid decontaminator (PA) (Steris I) or used as control (EP). Non-sterilized NiTi stents and commercially available balloon expandable Palmaz stents were cleaned in soapy water and methanol and used in the second part of the study (n= 10).

impression sinee.vi
S:\legare\Bckup-Porto\Maîtrise30-7-99\Prog-traitement-labview version 5\lecture résultats de sinee.l
Impression sinee.vi
Last modified on 9/13/99 at 1:50 PM
Printed on 10/1/99 at 4:48 PM



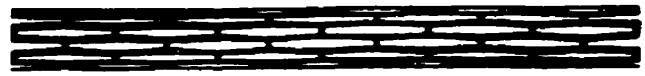


Figure IV-13: NiTi stent measuring 30 mm in length and 3 mm in diameter reproducing the design of the palmaz® stents (J&J, Cordis Corporation, USA)

Table IV-8: Characteristics of stainless steel and nitinol stents used in the study

	Geometry	Metal-to surface area	Materials	Treatments	Surface composition
Stainless steel	Laser cutted tube	~ 8%	Stainless steel (316 L)	Electropolishing and cleaning	Ti oxide with few amount of nickel
Nitinol	Laser cutted tube	~ 8%	Nitinol (nickel:55.8 wt%)	Electropolishing and cleaning	Cr and Fe oxide with few amount of nickel

METHODS

Animal preparation

All procedures followed the American Heart Association Guidelines for Animal Research and were approved by the animal ethic committee of the Montreal Heart Institute. Experiments were performed using 10 pigs weighing 25 ± 5 kg. Animals were sedated by an intramuscular injection of 20 mg/Kg ketamine (Rogarsetic, Rogar/STB Inc, Montréal, Canada) and 2 mg/Kg azaperone (Stresnil, Janssen Pharmaceuticals, Mississauga, Ontario, Canada). Anaesthesia was maintained with 0.5-0.75% halothane (Fluothane, Ayerst, Montreal, Quebec, Canada) following endotracheal intubation. The left femoral artery and the right femoral vein were canulated to establish an extracorporeal circuit. Arterial pressure and ECG were monitored continuously during the experiment. Animals were administrated 50 U/Kg of heparin initially and additional 25 U/kg prior to each

perfusion to reach an Activated Clotting Time (ACT) of 200 ± 30 sec (Hemochron®, ITC, USA).

Isolation and labeling

Using the method described by Mehri *et al.*, platelets were isolated and radio-labeled with Chromium-51[22] (^{51}Cr, Merck Frosst Canada Inc., Montréal, Canada). An autologous blood sample of 120 mL was collected 3 hours before the beginning of the experiment and anticoagulated with acid-citrate-dextrose (ACD). The sample was then centrifuged at low speed to obtain a platelet-rich plasma. This platelet suspension was washed, eliminated from contaminated red blood cells by a low-speed centrifugation. The suspension was then incubated with ^{51}Cr for 30 min before being resuspended and reinjected into the animal 1 hour prior to the experimentation. The quantification of fibrinogen deposition was achieved with ^{125}I-human fibrinogen (Amersham International plc, Buckinghamshire, England) injected one hour before the experiment (~10 μCi).

Stents insertion

Prior to each perfusion, stents were inserted manually in Silastic® tubes (Medical grade, Dow Corning, USA) using talc free surgical gloves and a sterile filament as a positioning device. The tubes were 1/8 inch in internal diameter (ID) and 9 cm long. A deflated 3.0 mm × 20 mm semi-compliant coronary angioplasty balloon catheter was then inserted in stented tubes and inflated at 12 atm for 18 sec to optimize stent deployment. Even though nitinol stents are self-expanding devices and do not require balloon expansion for deployment, they were implanted using the same method as for stainless steel stents to avoid differences in manipulation of each devices.

Extracorporeal AV Shunt

The extracorporeal AV shunt was composed of a silicon tubing circuit connecting the left femoral artery to the perfusion channels and returning to the right femoral vein (Fig. IV-14). The main extracorporeal AV shunt was separated in 4 (effects of sterilization processes on NiTi) or 2 (effects of shear rate on NiTi versus stainless steel) parallel channels systems in the perfusion chamber and linked to 4 (or 2) silastic tubes (3.1 mm in diameter, 9 cm length) in which the tested stents were inserted. The blood flow was maintained by a roller pump (Easy-load, Cole Parmer Inst. Co, USA) at a stable rate of either 40 or 80 mL per minute in the tubing containing the stents. The perfusion chamber was placed in a water bath maintained at 37 ± 1 °C.

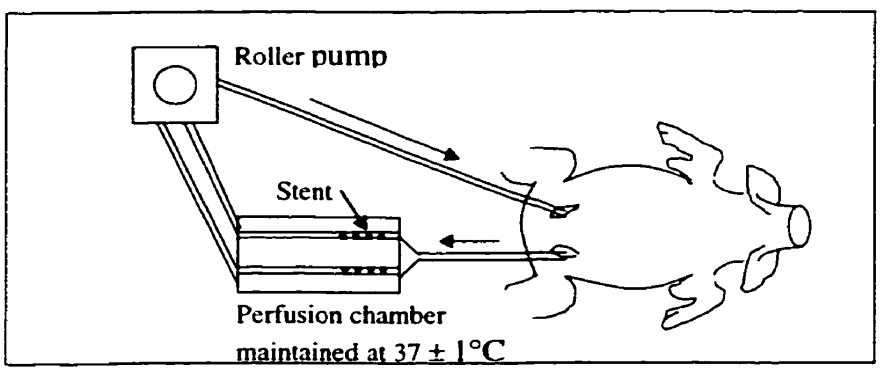


Figure IV-14: Schematic representation of the *ex vivo* AV shunt model: an extracorporeal circulation is carried out between the left femoral artery and the right femoral vein.

One hour after reinjection of the labeled platelets, the stents were mounted in each channel of the circuit perfusion chambers and the circuit was then rinsed for 60 sec using saline solution. Subsequently, blood was then allowed to circulate in the circuit for 15 min at a wall shear rate of either 228 sec^{-1} or 456 sec^{-1}, corresponding to 40 and 80 mL/min in 3.1 mm ID tubes. At the end of the perfusion, saline solution was used to wash

off unattached cells and blood from the stents and the perfusion circuit. Tubing segments containing the stents were then removed and cut at both distal and proximal ends. A segment of 1.5 cm in each proximal tube was then cut and used as a negative control. These tubing samples were fixed in 1.5% glutaraldehyde solution and kept at room temperature until quantification. The extracorporeal circuit was washed again with saline and a new series of stents was tested using the same procedure. At the end of the daily experiment, the amount of ^{51}Cr -platelet deposition and ^{125}I-fibrinogen adsorption was measured for each tubing segments containing or not a stent using a Minaxi 5000 gamma counter (Packard Instruments Co.). Student-T tests were used to determine the statistical significance of results.

Auger Electron Spectroscopy (AES)

AES analyses of the stents (n= 2) prior to *ex vivo* testing were performed by a JAMP-30 Auger system (JEOL, Japan) in derivative mode at 10 keV with an electron beam current of 0.5 μA. AES survey spectra (50-1500 eV) were recorded from at least three different locations on the samples. Depth profiles (0-500 nm) were measured by combining AES spectra analyses and ion sputter etching.

RESULTS

Surface analyses of electropolished NiTi stents

Using AES, we investigated the surface chemistry of electropolished NiTi and stainless steel stents. Spectra analyses, presented in Figure 3-a illustrate the average composition of the NiTi stents surface, i.e. titanium (~418 eV), nickel (~848 eV), and oxygen (~510 eV). The main surface contamination was carbon (~272 eV). The amount of titanium and

nickel on the surface of NiTi stents was 15% and less than 1% respectively (Table IV-8). AES depth profile indicated that the oxide layer thickness averaged 4 nm for electropolished NiTi. Conversely, stainless steel stents were covered by a chromium and iron oxide layer with an average thickness of 2 nm (Fig. IV-15). Scanning Electron Microscopy of the stents prior to *ex vivo* testing did not reveal any differences in surface topography.

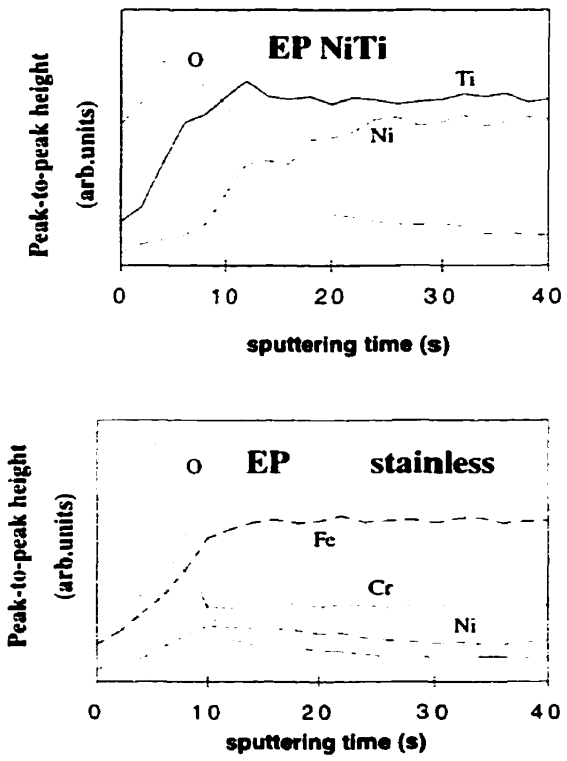


Figure IV-15. Depth profile for electropolished NiTi (left) and stainless steel (right) stents

Effect of sterilization on thrombogenicity of electropolished NiTi stents

The effect of sterilization processes on fibrinogen adsorption and platelet deposition at a wall shear rate of 228 sec^{-1} are presented in Figure IV-16. The fibrinogen deposition averaged 71.6 ± 56 cpm/stent for electropolished NiTi stents (n= 10). Steam autoclave- and Sterrad®- sterilized stents (n= 7) presented fibrinogen deposition values similar to that of electropolished. There was a statistically nonsignificant trend to lower fibrinogen adsorption for the ethylene oxide (23.1 ± 13.9 cpm/stent, n= 7) and peracetic acid (18.9 ± 13.5 cpm/stent, n= 6) processed stents in comparison to electropolished stents ($p > 0.05$). The platelet adhesion pattern was similar to that of fibrin(ogen) deposition. The mean of platelet adhesion was 300 ± 226×10^6 platelets/stent for electropolished group, and no statistically significant difference was observed with sterilized NiTi stents ($p > 0.05$) despite trend for EO and PA groups toward decreasing platelets adhesion.

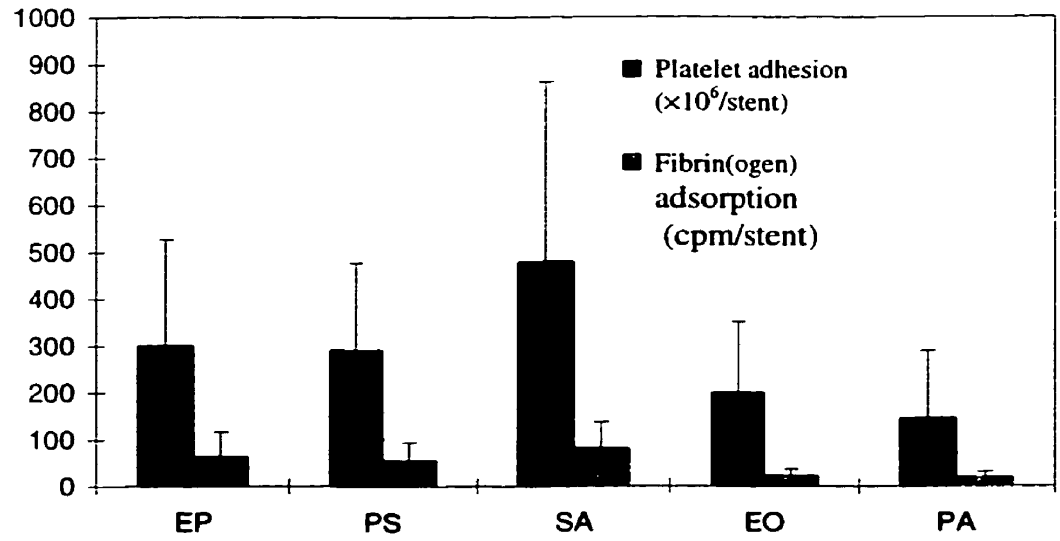


Figure IV-16. Effect of sterilization processes on the ^{125}I-fibrinogen adsorption and ^{51}Cr-platelet adhesion on electropolished NiTi stents after 15 min of perfusion.

Effect of blood flow on platelets adhesion of electropolished NiTi stents in comparison to stainless steel

The platelet adhesion was dramatically affected by blood flow for stainless steel stents as measured in our *ex vivo* model. At a wall shear rate of 228 sec^{-1}, no significant difference on the amount of ^{51}Cr-labelled platelets adhesion on stainless steel (159 ± 86×10^6 platelets/stent, n= 5) and NiTi stents (103 ± 90×10^6 platelets/stent, n= 5) was measured. As shown in figures IV-17,18 at a wall shear rate of 456 sec^{-1}, NiTi stents presented significantly less adhered platelets than stainless steel (298 ± 252×10^6 platelets/stent, n= 9 for NiTi vs 1037 ± 280×10^6 platelets/stent, n= 9 for stainless steel, p= 0.0035). Despite an increase in the amount of adhered platelets on NiTi stents, there were no significant differences between 228 sec^{-1} and 456 sec^{-1} ($p > 0.05$). However, platelets adhesion on stainless steel stents was dramatically blood flow- dependent since an increase in the shear rate significantly increases the adhesion during the perfusion (p= 0.0002, Fig. 7).

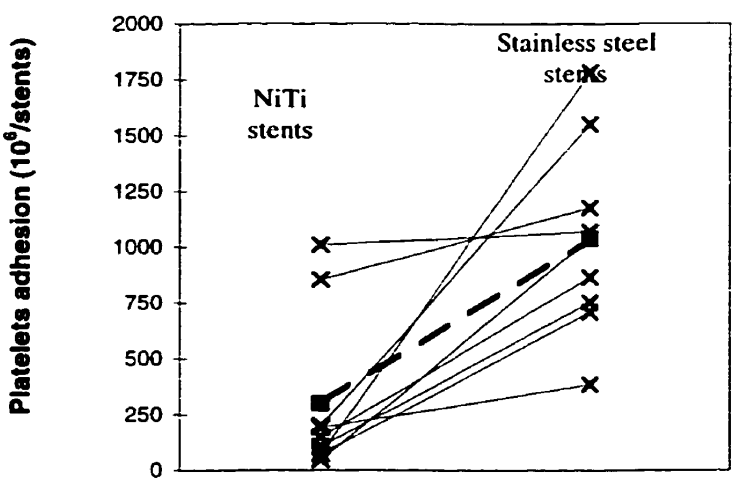


Figure IV-17. Comparison between the amount of platelets adhesion for each perfusion (n= 9) at a wall shear rate of 456 sec^{-1} for NiTi stents and stainless steel stents (the dotted line indicates the mean value)

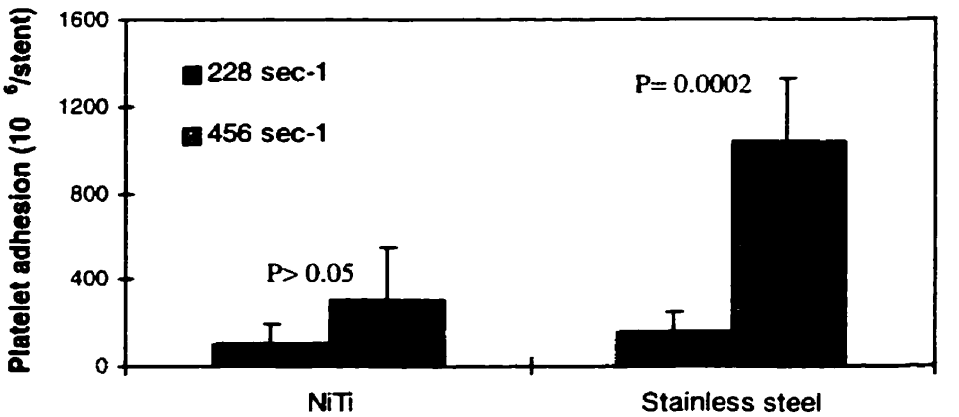


Figure IV-18. Effect of the shear rate on the adhesion of ^{111}I-platelet on NiTi stents, stainless steel stents and control silastic tubes after 15 min of perfusion.

Morphological analyses of the stents post perfusion

Macroscopic observation of the stents confirmed these differences since NiTi stents presented only few amount of white and/or red thrombus principally located at the strut intersections whereas stainless steel stents showed clearly more thrombus.

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the effect of surface modifications induced by sterilization techniques on the thrombogenicity of NiTi alloy. In addition, it aimed to compare the relative thrombogenicity of NiTi and stainless steel stents of same design under wall shear rates in the range to those encountered *in vivo*[23]. From our *ex vivo* study, the sterilization did not induce significant modifications in the thrombogenicity of NiTi stents. Among tested sterilization techniques, Sterrad® and steam autoclave did not affect

the thrombogenicity of electropolished NiTi stents. Peracetic acid and ethylene oxide techniques tends to slightly decrease the NiTi stents thrombogenicity as indicated by the lower mean fibrinogen adsorption and platelets adhesion on the EO and PA processed stents. Although these modifications remained under statistical signification value ($p > 0.05$), it can not be excluded that a more powerful protocol with more samples would concluded on significant differences. Still, it can be expected that sterilization and the resulting surface modifications would not dramatically modify the thrombogenicity of NiTi stents. Previous works have shown that both EO and PA techniques have induced relatively high surface energy and smoother surfaces that might explain the trend to lower thrombogenicity[17]. Indeed, thrombus formation is a dynamic process which involves many parameters. This process is initiated by adsorption of plasma-protein such as fibrinogen which in turn leads to the deposition of platelets. The formation of a irreversible thrombus is related to the denaturation of adsorbed fibrinogen into fibrin monomer and fibrinopeptides and activation of platelets[24,25]. Many studies have investigated the effects of surface properties of metallic devices in contact with blood[26,27]. It is well known that the surface energy have a strong influence on the surface-adsorbed plasma proteins and therefore on the surface-adhering cells such as platelets. Moreover, Hehrlein *et al.* suggested that the topography was the most important factor for coated stainless steel stents[28]. In addition, stents design was reported to influence thrombus formation[29]. Some studies have reported significant differences in the thrombogenicity of commercially available stents such as balloon expandable Palmaz stents and self expandable Wallstents which have different design (slotted tube vs mesh) and composition (stainless steel vs cobalt alloy with platinium core)[16]. Besides design and surface chemistry, the optimal deployment of the device to minimize disturbances in local rheology is also of primary importance in reducing mural thrombus formation and thus, decreasing the rate of acute and subacute thrombogenic occlusion[30]. However, high pressure deployment used to achieve optimal deployment may increase vessel media and intima trauma, and as a consequence, increases the risk of restenosis. Due to their superelastic structure, self expanding NiTi stents can theorically be deployed without

balloon inflation. However, specific atherosclerotic vessels may require adjunctive balloon post-deployment to assure efficient dilatation of calcified plaques. When considering the numerous specificity's of endoluminal stents, it is very difficult to determine which one of their characteristics influence more the thrombogenicity of the device after implantation.

Based on the above, non-sterilized NiTi and stainless steel stents of same design were used to characterize the relative thrombogenicity of both materials. From our results, the statistically significant difference between NiTi and stainless steel in terms of platelet adhesion along with macroscopic observations of the stents after perfusion indicate that stainless steel stents induced more thrombus formation, especially at a wall shear rate of 456 sec^{-1}. Conversely, stainless steel stents were highly blood flow dependent in our *ex vivo* model. They presented a significant increase of adhering platelets of almost 7 folds at 456 sec^{-1} ($p= 0.0002$), while NiTi stents showed a non statistically significant increase ($p> 0.05$). No differences were observed with SEM on the stents topography prior to the experiment. Both type of stents were electropolished which has been demonstrated to decrease stents thrombogenicity by improving their surface characteristics. Since the stents design was similar, these results may be related to their respective surface chemistry. AES analyses have shown that stainless steel stents were covered by chromium and iron oxide with limited amount of nickel, while the NiTi stents surface was composed of titanium oxide (mainly TiO_2). These surface compositions may explain the less thrombogenic properties of NiTi stents. Nygren *et al.* have demonstrated the dependency of TiO_2 characteristics on the surface fibrin(ogen) adsorption and platelets adhesion[27]. Moreover, it has been recently suggested that TiO_{2-x} oxide films may prevent the denaturation of fibrinogen by inhibiting the transfer of charges from fibrinogen to the surface of the material[24]. Thus, the TiO_2 rich surface of NiTi stents may have prevented the formation of an irreversible platelet-rich thrombus and, as a consequence, promoted its fragmentation by blood flow. Indeed, while an increase in the flow increases the number of circulating blood components, and thus enhances the thrombus formation, it

also increases the shearing force able to fragment this thrombus[23]. While in agreement with those of Sheth *et al.*, obtained with NiTi and stainless steel stents of different designs in a rabbit carotid artery model[6], our results demonstrate that independently of the design and extent of vessel wall injury, the surface materials itself has a obvious influence on the thrombogenicity of metallic stents. Many research project have been devoted to reduce the metallic stents thrombogenicity[12]. Indeed, thrombus formation should be reduced as low as possible to avoid acute and subacute clinical complications. Moreover, thrombogenic material accumulation within the stented vessel are expected to contribute to neointimal proliferation processes through platelets-derived growth factors release and expression of the Gp IIb/IIIa receptor on the platelet surface[11]. The EPIC, EPILOG and EPISTENT trials have shown that prevention of thrombus formation by IIb/IIIa antagonist have a beneficial effect on both short term and long term complications in PTCA procedures[31,32]. Reduction of restenosis trough prevention of thrombus formation is also suggested by the success of anti-platelet therapy after coronary stenting in the ISAR and STARS trials[33,34]. In addition, the decrease in neointimal thickening observed in a recent study following thrombus formation reduction by surface characteristics improvements suggests clinical relevance of this issue. Still, further studies is required to conclude whether or not the lower thrombogenicity observed for NiTi stents may have an effect on acute or subacute complication rates and/or on long-term need for revascularization.

CONCLUSIONS

In an ex vivo extracorporeal model, we determined that sterilization do not significantly modify the thrombogenicty of NiTi stents. Stainless steel stents were more blood flow dependent than NiTi stents, and significantly more thrombogenic at a wall shear rate of 456 sec^{-1}. The latter was related to the surface chemistry of NiTi, namely titanium oxide, which may prevent thrombus growth within the stents.

When considering their clinical relevance, our results should be carefully analyzed in regard to the methodology used in our study. Also, some limitations such as the use of inert silastic tube instead of vessel wall and the lack of antiplatelets therapy may decrease the clinical relevance of our results. Yet, the sterilization of NiTi stents did not appear to modify the thrombogenicity of the device. Conversely, stainless steel stents enhanced thrombus formation in comparison to NiTi stents. Along with the favorable thermoelastic properties of NiTi alloy, the latter seems to justify its increasing use as a material for peripheral and coronary stents.

This work was partly supported by NSERC. We thank Cordis Corporation - Nitinol Devices & Components (Fremont, CA) for their technical and financial support. The authors also wish to thank Dr. T. Ahn, P. Thai and J. F. Théorêt from the Montreal Heart Institute for their excellent technical assistance and St-Eustache and Charles Lemoyne hospitals for sterilization process.

References

[1] P. W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneiji *et al.*, "A comparison of balloon expendable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease," *N. Engl. J. Med.*, **331**, 489-495 (1994)

[2] D. R. Holmes, M. R. Bell, D. R. Holmes *et al.*, "Interventional cardiology and intracoronary stents-a changing practice: approved vs. Nonapproved indications," *Cathet. Cardiovasc. Diagn.*, **40**, 133-138 (1997)

---

[3] C. S. Sutton, R. Tominaga, H. Harasaki, H. Emoto, T. Oku *et al.*, "Vascular stenting in normal andatherosclerotic rabbit : studies of the intravascular endoprothesis of titanium-nickel alloy," *Circulation*, **81**, 667-683 (1990)

[4] A. J. Carter, D. Scott, J. R. Laird, L. Bailey, J. A. Kovach, T. G. Hoopes *et al.*, "Progressive vascular remodeling and reduced neointimal formation after placement of a thermoelastic self-expanding Nitinol stent in an experimental model," *Cathet. Cardiovasc. Diagn.*, **44**, 193-201 (1998)

[5] M. Henry, M. Amor, R. Beyar, I. Henry, J. M. Porte, B. Mentre *et al.*, "Clinical experience with a new nitinol self-expanding stent in peripheral arteries," *J. Endovasc. Surg.*, **3**(4):369-79 (1996)

[6] S. Sheth, F. Litvack, V. Dev, M. C. Fishbein, J. S. Forrester, N. Eigler, "Subacute thrombosis and vascular injury resulting from slotted-tube Nitinol and stainless steel stents in a rabbit carotid artery model," *Circulation*, **94**, 1733-1740 (1996)

[7] E. Rechavia, M. C. Fishbien, T. DeFrance, M. Nakamura, A. Parikh, F. Litvack, N. Eigler, "Temporary arterial stenting: Comparison to permanent stenting and conventional ballon injury in a rabbit carotid artery model," *Cath. Cardiovasc. Diagn.*, **41**, 85-92 (1997)

[8] T. A. Horbett, "The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion, Colloids and Surfaces," *B. Biointerfaces*, **2**, 225-236 (1994)

[9] R. R. Makkar, S. Kaul, M. Nakamura, V. Dev, F. I. Litvack, K. Park, "Modulation of acute stent thrombosis by metal surface characteristics and shear rate," *Circulation*, **92**(8), I-86 (abstract) (1995)

---

[10] D. Keane, A. J. Azar, P. W. Serruys, C. Macaya, W. Rutsch, U. Sigwart, A. Comlombo, J. Marco, S. Klugmann, P. Crean, "On behalf of the BENESTENT investigators. Outcome following elective stent implantation in small coronary arteries," *Eur. Heart J.*, **16**, 335 (abstract) (1995)

[11] R. Komatsu, M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima, A. E. Becker, "Neointimal tissue responses at sites of coronary stenting in humans - Macroscopic, histological and immunohistochemical analyses," *Circulation*, **98**, 224-233 (1998)

[12] I. De Scheerder, E. Verbeken, J. Van Humbeeck, "Metallic surface modification," *Semin. Interv. Cardiol.*, **3**(3-4), 139-144 (1998)

[13] K. Schurmann, D. Vorwerk, A. Bucker, J. Neuerburg, B. Klosterhalfen, R. W. Gunther *et al.*, "Perigrapht inflamation due to dacron-covered stents grafts in sheep iliac arteries: Correlation of MIR imaging and histopathologic findings," *Radiology*, **204**, 757-763 (1997)

[14] R. R. Makar, N. L. Eigler, S. Kaul, A. Frimerman, M. Nakamura, P. K. Shah, J. S. Forrester, J.-M. Hebert, F. Litvack, "Effects of clopidogrel, aspirin and combined therapy in a porcine *ex vivo* model of high-shear induced stent thromobosis," *Eur. Heart J.*, **10**, 1538-1546 (1998)

[15] C. Rogers, E. R. Edelman, "Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis," *Circulation*, **91**, 2995-3001 (1995)

---

[16] V. Siegerstetter, T. Krause, K. Haag, A. Ochs, K.-H. Hauenstein, H. E. Moser, "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) Thrombogenicity in stents and its effects on shunt patency," *Acta radiologica*, **38**, 558-564 (1997)

[17] B. Thierry, M. Tabrizian, O. Savadogo, L'H. Yahia, "Effects of sterilisation processes on NiTi alloy - surface characterizations," *J. Biomed. Mater. Res (in press)*

[18] S. Shabalovskaya, J. Andereeg, "Surface spectroscopic characterization of NiTi equiatomic shape memory alloys for implants," *J. Vac. Sci. Technol.* **A, 13** (5) (1995)

[19] D. A. Armitage, D. M. Grant, T. L. Parker, K. G. Parker, "Haemocompatibility of surface modified NiTi," SMST-97: Proceedings of the second international conference on shape memory and superelastic technologies, Pacific Grove, USA (1997)

[20] C. S. Sutton, P. M. Consigny, M. Thakur, "Thrombogenicity of intravascular stent wires," Circulation, 90 (suppl I): I-9 (abstract) (1994)

[21] S. R. Hanson, K. S. Sakariassen, "Blood flow and antithrombotic drug effects," *Am. Heart J.*, **135**, S132-S145 (1998)

[22] Y. Merhi, M. King, R. Guidoin, "Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: Neutrophil, Platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions," *J. Biomed. Mater. Res*, **34**, 477-485 (1997)

[23] S. R. Hanson, K. S. Sakariassen, "Blood flow and antithrombotic drug effects," *Am. Heart J.*, **135**, S132-S145 (1998)

---

[24] P. Baurschmidt, M. Schaldach, "The electrochemical aspects of the thrombogenicity of a material," *J. Bioengineering*, **1**, 261-278 (1977)

[25] H. Nan, Y. Ping, C. Xuan, L. Yongxuan, Z. Xiaolan, C. Guangjun et al., "Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthetized by ion beam enhanced deposition," *Biomaterials*, **19**, 771-776 (1998)

[26] V. E. D. E. Palma, R. E. Baier, "Investigation of three-surface properties of several metals and their relation to blood biocompatibility," *J. Biomed. Mat. Res.* **3**, 37-75 (1972)

[27] H. Nygren, C. Erikson, J. Lausma, "Adhesion and activation of platelets and polymorphonuclear granulocyte cells at TiO_2 surfaces," *J. Lab. Clin. Med.*, **129**, 35-46 (1997)

[28] C. Hehrlein, M. Zimmermann, J. Metz, W. Ensinger, W. Kübler, "Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents," *Cor. Art. Dis*, **6**, 581-586 (1995)

[29] C. R. Rogers, E. R. Edelman, "Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis," *Circulation*, **91**, 2995-3001 (1995)

[30] S. L. Goldberg, C. Di Mario, P. Hall, A. Colombo, "Comparison of aggressive versus nonaggressive balloon dilatation for stent deployment on late loss and restenosis in native coronary arteries," *Am. J. Cardiol.*, **81**, 708-712 (1998)

[31] The EPIC investigators, "Use of a monoclonal antibody directed against glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty," *New Engl. J. Med.*, **3330**, 956-961 (1994)

---

[32] The EPILOG investigators, "Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization," *New Engl. J. Med.*, **336**, 1689-1696 (1997)

[33] A. Schomig, F. J. Neumann, A. Kastrati *et al.*, "A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents," *New Engl. J. Med.*, **334**, 1084-1089 (1996)

[34] M. Leon, D. Baim, J. Popma *et al.*, "A clinical trial comparing three anti-thrombotic drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators," *New Engl. J. Med.*, **339**, 1665-1671 (1998)

CHAPITRE V - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Effet de l'electropolissage sur l'oxyde de surface

Ainsi que nous l'avons mentionné dans le chapitre II de ce présent document, la couche passive à un rôle crucial sur le comportement en corrosion des alliages passivables tels que le NiTi. Ces oxydes sont eux-même dépendants des traitements de surface appliqués à l'alliage. Dans le cadre de notre étude, la comparaison des disques polis mécaniquement et électropolis a révélé des différences significatives entre les deux traitements, tant au niveau de la composition chimique de la surface que de sa topographie. Les analyses réalisées par microscopie à force atomique ont clairement indiqué des morphologies de surface différentes consécutives à l'électropolissage. Toutefois, malgré ces différences, aucune modification notable de la rugosité moyenne n'a été observée. Les analyses chimiques effectuées par spectroscopie Auger confirment ces modifications de surface. La concentration surfacique de nickel est ainsi considérablement réduite par l'électropolissage (de près de 11.5% à 1%) et, par conséquent, le ratio Ti/Ni, qui est une indication de la composition de l'oxyde de surface affranchie des effets de la contamination, est augmenté de 0.9 à 15. La surface du NiTi électropolie est donc constituée d'une couche superficielle d'oxyde de titane (de type TiO_2), avec très peu de nickel. Cette oxyde, d'une épaisseur moyenne de l'ordre de 4 nm, fait ensuite place à une couche de transition constituée d'oxyde de titane et de nickel, et enfin au cœur de l'alliage. Les premiers travaux effectués dans nos laboratoires sur des stents en NiTi ont suggéré l'effet positif de cette couche d'oxyde, plus homogène, résultant de l'electropolissage (Trépanier *et al.*, 1999). Notre deuxième objectif était donc de caractériser l'effet de cet oxyde de surface de meilleure "qualité" sur la résistance à la corrosion du NiTi.

Effet de l'électropolissage sur la corrosion du NiTi

Nous avons utilisé à cet effet des tests de polarisation cycliques dans une solution physiologique de Hank's. Ces tests de polarisation cycliques effectués sur les disques ont ainsi mis en évidence une résistance à la corrosion élevée et reproductible (0.99 ± 0.05 V/SCE) pour le NiTi électropoli. Ceci constitue une observation très importante, car de précédentes études ont indiqué des potentiels de rupture du film passif très variables pour le NiTi (Nakayama, 1989). Ces potentiels variables sont à rapprocher de ceux observés dans notre étude pour les échantillons polis mécaniquement, et sont reliés à des surfaces présentant des artefacts pouvant initier des processus de corrosion. En effet, la présence de défauts de surface, de précipités, de joints de grain, de tensions de surface, etc., induites par exemple, par le polissage mécanique, sont autant de "faiblesses" dans la couche d'oxyde. L'électropolissage, en créant un oxyde de surface plus homogène et riche en TiO_2, limite les risques de rupture prématurée du film passif, augmentant par là même le potentiel de rupture de l'alliage et la reproductibilité des résultats. Ces potentiels de rupture relativement élevés observés dans notre étude laissent penser qu'un implant en NiTi est peu susceptible de se corroder de manière localisée dans le cadre d'une utilisation "normale". Ce point est particulièrement important si l'on considère que les cas d'échec de prothèses sont généralement associés à des conditions d'utilisation particulières, dans lesquelles le film protecteur peut, par exemple, être détruit par des frottements trop importants. La bonne résistance aux phénomènes de corrosion observée cliniquement pour des implants en NiTi semblent corroborer nos résultats obtenus *in vitro*.

Effets de différentes techniques de stérilisation sur les propriétés de surface du NiTi

D'une manière générale, la stérilisation par autoclave s'est avérée la plus capable d'induire des modifications de surface sur les disques en NiTi. Quoique faible et hétérogène, la croissance d'oxyde observée par AES n'est pas surprenante au vue de travaux déjà rapportés sur la croissance thermique des oxydes de surface sur de tels alliages (Vichev *et al.* 1998). De plus, la surface relativement exempte de défauts, crée par l'électropolissage est de nature à réduire la croissance thermique de ces oxydes de surface. Cette croissance s'est accompagnée d'une modification de la topographie (surface plus rugueuse et très hétérogène) et de la composition chimique, correspondant à une augmentation de la quantité de nickel à la surface de l'alliage. Néanmoins, l'examen des profils Auger révèle que cette couche relativement enrichie en nickel par rapport à l'alliage electropoli est suivie d'une zone riche en oxyde de titane. La stérilisation par autoclave semble donc avoir entraînée une diffusion du nickel au travers de la matrice défective d'oxyde de titane, modifiant ainsi le ratio surfacique Ti/Ni. Cependant, l'augmentation reste faible et la quantité de nickel présente dans les premières couches atomiques de la surface peut être considérée comme relativement constante. La stérilisation par autoclave a également généré une contamination par des composantes inorganiques, observées en faible quantité par AES. Ce dernier point est en accord avec la diminution d'énergie de surface mesurée sur les échantillons "autoclavés", puisque de tels contaminations inorganiques diminue la mouillabilité des matériaux.

Les modes de stérilisation par chaleur sèche et par oxyde d'éthylène ont modifié la couche d'oxyde de surface de manière similaire à l'autoclave. Ainsi, l'analyse effectuée par AES indique une légère augmentation (non significative d'un point de vue statistique) de l'épaisseur de la couche d'oxyde et du pourcentage de nickel à la surface. La topographie des échantillons stérilisés par chaleur sèche se caractérise par une plus grande rugosité, mais reste relativement homogène. Cette rugosité peut être reliée à l'augmentation de la mouillabilité observée lors des essais de mesure de l'angle de contact. En effet, une rugosité plus importante augmente la surface d'échange par unité de surface, ce qui a pour effet apparent d'augmenter l'énergie "stockée" dans cette même

surface. La topographie de surface de l'alliage stérilisé par oxyde d'éthylène ne diffère par significativement de celle de l'alliage electropolie, si ce n'est par la présence aléatoire de quelques contaminations de surface visibles à l'AFM.

Parmi les techniques, dites "nouvelles", testées, la stérilisation par acide péracétique n'a pas sensiblement modifié la couche d'oxyde ou la topographie de l'alliage. Certaines hétérogénéités observées avec l'AFM laisse cependant penser que cette technique est susceptible d'initier des phénomènes de corrosion localisée de faible amplitude. Parallèlement, la stérilisation par acide péracétique a augmenté significativement l'énergie de surface de l'alliage. Une augmentation encore plus importante a été observée dans le cas des techniques dites "à base plasma", c'est à dire le système Sterrad®-100S et le système Plazlyte®. La composante polaire des échantillons stérilisés par ces techniques a considérablement augmentée, conduisant ainsi à des énergies de surface significativement plus élevées (augmentation de l'ordre de 100%) par rapport aux contrôles électropolis. Ces deux techniques n'ont pas modifié notablement la composition chimique ou la topographie de la surface, en dehors d'une faible augmentation de la rugosité pour Sterrad®-100S.

Effet de différentes techniques de stérilisation sur la résistance aux phénomènes de corrosion localisée du NiTi

Pour déterminer l'effet des modifications de surface induites par la stérilisation sur la résistance à la corrosion du NiTi, nous avons procédé également à des tests de polarisation cycliques sur des disques stérilisés par les différentes techniques. Sur tous les paramètres observés, c'est à dire le potentiel de rupture du film passif, le potentiel de re-passivation, le potentiel au repos, la densité de courrant de corrosion et le courrant de passivation, nous n'avons pas observé de modifications significatives par les techniques

de stérilisation par oxyde d'éthylène et Sterrad®. Certains échantillons stérilisés par autoclave (2 sur 6) et par acide péracétique (1 sur 6) ont présenté des potentiels de rupture relativement faibles, correspondant à des phénomènes de corrosion observables macroscopiquement. Les caractérisations de surface effectuées sur les disques stérilisés suggèrent que ces deux techniques de stérilisation sont capables d'affaiblir le film protecteur de surface par la création de défauts et la formation de précipités, augmentant ainsi le risque de rupture prématurée de l'oxyde de surface. Cependant, vu le nombre réduit d'échantillons concernés, d'autres facteurs tels que la manipulation des échantillons durant les processus de stérilisation peuvent également être la cause de ces résultats. D'une manière générale, la résistance à la corrosion localisée du NiTi électropoli et stérilisé est bonne, et reste supérieure à celle de l'acier inoxydable. Sur la base de ces résultats, les différents modes de stérilisation testés ne devraient pas augmenter cliniquement le risque de corrosion localisée.

A partir des courbes de polarisation cyclique, les densités de courrant de corrosion ont été déterminées par extrapolation des pentes de Tafel. Selon la norme ASTM-G102-89, ces densités de courrant permettent d'estimer les taux de corrosion. Quoique approximative, cette méthode nous a permis d'évaluer l'effet relatif de la stérilisation sur les taux de corrosion pour les groupes d'échantillon. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes, ce qui laisse suggérer des taux de corrosion similaires pour les échantillons stérilisés. Ceci nous a poussé à n'effectuer des tests "par perte de masse" que sur les échantillons électropolis pour comparer ces taux de libérations ioniques avec ceux de l'acier inoxydable électropoli.

Libération ionique par dissolution passive

Les essais par perte de masse réalisés par absorption atomique sur des stents electropolis en NiTi et en acier inoxydable ont permis de déterminer la cinétique de libération par dissolution passive du nickel (et du chrome dans le cas de l'acier inoxydable). Notre étude indique que le NiTi électropoli libère dans les premiers jours et de manière sélective (par rapport au titane) plus de nickel que l'acier inoxydable. Le taux de libération tend à diminuer jusqu'à des valeurs en dessous du seuil de détection de l'appareillage utilisé. Les profils de libération observés suivent une loi de type logarithmique en fonction du temps. Ainsi, au bout de 17 jours, aucune libération de nickel n'était détectable aussi bien pour le NiTi que pour l'acier inoxydable.

Au regard des autres études réalisées dans des conditions similaires, les taux de libération ionique observés pour le NiTi électropoli sont faibles et semblent bien en dessous des seuils de toxicité. On peut donc escompter que dans le cadre d'une utilisation adéquate du NiTi, la quantité de nickel libérée par l'implant de manière passive n'aura pas d'effet toxique ou systémique sur l'organisme du patient. Néanmoins, tout comme pour la corrosion localisée, des facteurs extérieurs peuvent fortement influencer ces taux de libération. Une attention toute particulière doit donc être portée lors de la conception et de l'implantation des implants pour limiter ces risques (frottements, contraintes, etc.). D'une manière générale, les risques de corrosion *in vivo* sont reliés aussi bien aux propriétés intrinsèques de l'implant qu'aux conditions d'utilisation et de mise en place de celui-ci.

Effets de la stérilisation sur la thrombogénicité du NiTi

La thrombogénicité d'un stent étant intimement reliée à ses propriétés de surface, nous avons développé un modèle *ex vivo* pour caractériser l'adsorption des fibrinogènes et l'adhésion plaquettaire en contact avec le sang. Aucune différence significative n'a été mise en évidence lors de ces essais, mais une forte tendance vers une plus faible

thrombogénicité a été observée pour les échantillons traités par les techniques d'oxyde d'éthylène et d'acide péracétique. Cette tendance est en accord avec les caractérisations de surface effectuées sur les échantillons stérilisés. En effet, une énergie de surface élevée et une surface sans aspérités, tels qu'observées sur les échantillons stérilisés par oxyde d'éthylène et acide péracétique, sont des facteurs bénéfiques pour la réduction de la thrombogénicité d'un matériau.

Cependant, sur la base de ces premiers essais, le protocole utilisé lors de ceux-ci a été développé pour améliorer la sensibilité de la méthode. A partir de ce protocole normalisé, des essais "contractuels" ont été effectués sur des échantillons similaires à ceux utilisés dans notre étude. Il est possible que les différences observées, non significatives dans nos essais, puissent atteindre les limites statistiques de signifiance dans un protocole plus sensible tel que celui utilisé dans les essais suivants (comparaison NiTi versus acier inoxydable). Néanmoins, tout laisse penser que ces différences potentielles restent mineures et, en comparaison des nombreux paramètres, notamment physiologiques et ceux reliés à la géométrie et au déploiement du stent, n'influencent que peu la formation d'un thrombus après l'implantation d'un stent.

Thrombogénicité du NiTi versus acier inoxydable en fonction du débit sanguin

La comparaison de la thrombogénicité de stents en NiTi et en acier inoxydable a été effectuée par l'intermédiaire de la fabrication de stents en NiTi reproduisant précisément le design du stent commercial Palmaz (J&J, Cordis Corporation, USA). La formation de thrombus étant un phénomène dynamique, deux taux de cisaillement (correspondant à des débits sanguins différents) ont été utilisés lors des perfusions. Ces deux taux sont représentatifs de ceux rencontrés *in vivo* dans des artères de tailles moyennes. Les stents en acier inoxydable se sont avérés beaucoup plus sensibles au débit que les stents en NiTi, et d'une manière générale, nettement plus thrombogènes. La différence entre les

deux types de stents était suffisament importante pour être observable visuellement. Cependant, il est très difficile d'estimer les conséquences cliniques exactes de ces résultats. Il faut en effet tenir compte des nombreuses limitations associées à notre étude (procédure *ex vivo*, absence de médications, etc.). Néanmoins, sur la base des études pertinentes de la littérature, il semble que de telles différences soient de nature à modifier la formation de thrombus *in vivo*, et par conséquent capable d'influencer le taux de complication à court, moyen et long terme. Conjugués aux propriétés mécaniques uniques du NiTi, ces résultats justifient l'utilisation croissante de celui-ci dans le domaine des stents cardiovasculaires.

RECOMMANDATIONS

A l'issue de ce travail, nous considérons que les points suivants devraient faire l'objet d'études complémentaires.

En premier lieu, des tests identiques à ceux effectués dans cette étude devraient être entrepris, mais réalisés avec des échantillons non electropolis et stérilisés. Une telle étude permettrait de confirmer l'effet protecteur du traitement d'electropolissage et confèrerait une compréhension supplémentaire des mécanismes en jeu. De même, des tests de dissolution devraient être effectués avec des stents non electropolis.

De plus, l'étude de la résistance aux phénomènes de corrosion tels que réalisée et présentée dans ce présent document ne prend pas en compte les nombreux facteurs pouvant modifier ceux-ci dans le cadre d'applications cliniques. Ainsi, une étude des phénomènes de corrosion galvanique, par frottement, sous l'effet de contrainte, etc., semble nécessaire pour évaluer les risques reliés à l'utilisation clinique de prothèses en NiTi.

La repassivation du NiTi n'a été que peu étudiée jusqu'à ce jour. Une telle investigation apparaît indispensable, d'autant plus que ce processus semble complexe. La cinétique de repassivation du NiTi devrait ainsi faire l'objet d'une étude comparative avec les autres matériaux métalliques couramment utilisés dans la conception d'implants.

Dans le cadre spécifique des stents cardiovasculaires, aucune étude ne caractérise l'effet des libérations ioniques au niveau des parois vasculaires. Même si ces libérations sont faibles et semblent inférieures aux seuils de toxicité, ainsi que mis en évidence dans cette

étude, elles peuvent être suffisantes pour stimuler les réactions inflammatoires associées à l'implantation de telles prothèses.

Nos résultats ont également mis en évidence l'influence des taux de cisaillement sur le processus de formation de thrombus des stents en NiTi et en acier inoxydable. Une étude plus exhaustive est souhaitable pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes en jeu.

Enfin, la relation entre la formation d'un thrombus fibrino-plaquettaire et le processus de resténose reste conjoncturel. Il serait pertinent de réaliser une étude comparative *in vivo* avec des stents en NiTi et en acier inoxydable similaire à ceux utilisés dans le présent travail pour caractériser la prolifération néointimale associée à chaque type de stents. Ceci constituerait également une première étape dans l'évaluation des conséquences cliniques de notre étude. En effet, du fait des nombreuses limitations associées à notre travail, les implications cliniques des résultats observés restent conjoncturelles. Seule une étude multicentrique à moyen et long terme de grande envergure pourrait déterminer si les stents en NiTi sont effectivement moins thrombogènes que ceux en acier inoxydable, et surtout si cette différence est suffisamment marquée pour avoir des conséquences cliniques.

Références

Annual Book of ASTM Standards, Vol. 13.01. Philadelphia, PA: ASTM;1996: Section 13

ARMITAGE D. A., GRANT D. M., PARKER T. L., PARKER K. G. (1997). Haemocompatibility of surface modified NiTi, SMST-97: Proceedings of the second international conference on shape memory and superelastic technologies, Pacific Grove, USA

ARONSSON B.O., LAUSMA J., KASEMO B. (1997). Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic Biomaterials, J. Biomed. Mater. Res., 35, 49-73

ASSAD M., YAHIA L'H., RIVARD C.H., LEMIEUX N. (1998). In vitro biocompatibility assessment of a nickel-titanium alloy using electron microscopy in situ end labeling (EM-ISEL), J. Biomed. Mater. Res., 41, 154-161

AYERS R. A., SIMKE S. J., BATEMAN T. A., PETKUS A., SACHEDEVA R. L., GYUNTER C. (1999).V. E., Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks, J. Biomed. Mater. Res., 45, 42-47

BAIER R. E., MEYER A. E. (1988). Implant surface preparation, Int. J. Oral. Maxillofac. Impl., 3, 9-20

BASS J. K., FINE H., CISNERO G. J. (1993). Nickel hypersensitivity in the orthodontics patient, Am. J. Dentofacial. Orthop., 103, 280-285

BAURSCHMIDT P., SCHALDACH M. (1977). The electrochemical aspects of the thrombogenicity of a material, J. Bioengineering, 1, 261-278

BENYAR R. (1997). New Devices in Interventional Cardiology : present and future, Isr. J. Med. Sci., 32, 515-525

BERGER-GORBET M., BROXUP B., RIVARD C., YAHIA L'H. (1996). Biocompatibiliy testing of NiTi screws using immunohistochemistry on sections containing metallic implants, J. Biomed. Mater. Res., 32, 243-248

BIANCO P. D., DUCHEYNE P., CUCKLER M. (1996). Titanium serum and urine levels in the rabbits with a titanium implant in the absence of wear, Biomaterials, 17, 1937-1942

BOURACHOT M.L. *et al.* (1997). Les différents types de stent coronaire, Presse med., 26, 536-540

BOWER K.T., KELLER J.C., RANDOLPH B.A., WICK D.G., MICHAELS C.M. (1992). Optimization of surface morphology for enhanced osteoblast responses in vivo, Int. J. Oral Max. Impl., 7, 302-310

BROWN, S. A., FARNSWORTH L. J., MERRIT K., CROWE T. D. (1988), *In vitro* and *in vivo* metal ion release, J. Biomed. Mater. Res., 22, 321-338

BUSER D., SCHENK R. K., STEINMANN S. G., FIORELLINI J. P., FOX C. H., STICH H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium

implants. A histomorphometric study in miniature pigs, J. Biomed. Mater. Res., 25, 889-902

CARTER A. J., SCOTT D., LAIRD J. R., BAILEY L., KOVAC J. A., HOOPES T.G. et al. (1998). Progressive vascular remodeling and reduced neointimal formation after placement of a thermoelastic self-expanding Nitinol stent in an experimental model, Cathet. Cardiovasc. Diagn., 44, 193-201

COHEN D. J. (1999). Evaluation of the cost-effectiveness of coronary stenting: a societal perspective, Am. Heart J., 137, S133-S137

COLOMBO A., HALL P., NAKAMURA S., ALMAGOR Y., MAIELLO L., TOBIS J. (1995). Intracoronary stenting without antocoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance, Circulation, 91, 1676-1688

CRAGG A. H., LUNG G., RYSAVY J., CASTANEDA F., CASTANEDA-ZUNIGA W., AMPLATZ K. (1983). Non surgical placement of arterial endoprotheses: a new techniques using nitinol wire., Radiology, 147, 261-263

CRAMERS M., LUCHT L. (1977). Metal sensitivity in patients treated for tibial fractures with plates of stainless steel, Acta Orthop. Scand., 48, 245-249

CROTTY O. P., DAVIES E. H., JONES S. P. (1996). The effects of cross-infection control procedures on the tensile and flexural properties of superelastic nickel-titanium wires, *Br. J. Orthod.*, 23(1), 37-41

CUSTER F., ADDIGTON L. (1964). Physical changes of instruments during sterilization,

CWIKIEL W., HARNEK J., ZOUCAS E., STENRAM U. (1997). Proliferative response in smooth muscles cells after angioplasty or insertion of self-expanding stents, Acta Radiol., 38, 124-128

DAI K., CHU Y. (1996). Studies and application of NiTi shape memory alloys in the medical field in China, Biomed. Mater.Eng., 6(4), 233-240

DAVIS G. D., NATAN M., ANDERON K. A. (1983). Study of titanium oxides using Auger lines shapes, Appl. Surface Sci., 15, 321-333

DAVIS L. E., MAC DONALD N. C., PALMBERG P. W., RIACH G. E., WEBER R. E., Handbook of Auger Electron spectroscopy, Physical Electronics, Eden

DEMRI B., HAGE-ALI M., MORITZ M., MUSTER D. (1997). Surface characterization of C/Ti6Al4V coating treated with ion beam, Biomaterials, 18, 305-10

DOTTER C. T., BUSCHMANN R. W, MCKINNEY M. K, ROSCH J. (1983). Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: Preliminary report, Radiology, 147, 97-102

DUMITRIU S. (editor) (1994). Blood-contacting polymers, Polymeric Biomaterials, Marcel Dekker, inc., pp. 349-366

DUTTA R. S., MADANGOPAL K., GADICAVR H. S., BANERJEE S. (1993). Biocompatibility of NiTi shape memory alloy, Brit. Corr. J., 28(3), 217-221

ESPOSITO M., J. LAUSMAA, HIRSCH J.-M., THOMEN P. (1999). Surface analyses of failed oral titanium implants, J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.), 48, 559-568

FILIP P. (1994). Metallic Materials, 32, 1

FLYVHOM M.A., NIELSEN G.D., ANDERSEN A. (1984). Nickel content of blood and estimation of dietary intake, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 179, 427-431

VAN DER GIESSEN W. J., GROLLIER G., HOORNTJE J. C., HEYNDRICKX G., MOREL M., SERRUYS P. W. (1997). The ESSEX study : first clinical experience with the self-expanding, nitinol radius stent, Circulation, (Abstract)

GILBERT J. L., ZARKA L., CHANG E., THOMAS C. H. (1998). The reduction half cell in biomaterials corrosion: oxygen diffusion profiles near and cell response to polarized titanium surfaces, J. Biomed. Mater. Res., 42(2), 321-30

GOLDBERG S. L., C. DI MARIO, HALL P., COLOMBO A. (1998). Comparison of aggressive versus non aggressive balloon dilatation for stent deployment on late loss and restenosis in native coronary arteries, Am. J. Cardiol., 81, 708-712

GOODMAN S. L. (1999). Sheep, pigs, and human platelets-material interactions with model cardiovascular biomaterials, J. Biomed. Mater. Res., 45, 240-250

GRUETZIG A. R., SENNING A., SIEGENTHALER W. E. (1979). Nonoperative dilatation of coronary artery stenosis : percutaneous transluminal coronary angioplasty, N Engl J Med, 301, 61-68

HANAWA T., ASAMI K., ASAOKA K. (1998). Repassivation and surface oxide film regenerated in similated bioloquid, J. Biomed. Mater. Res., 40, 530-538 (

HANAWA T., ODA M. (1991). Calcium phosphates naturally formed on titanium in electrolyte solution, Biomaterials, 12, 767-774

HARNEK J., ZOUCAS E., CARLEMALM E., CWIEKIEL W. (1999). Differences in endothelial injury after balloon angioplasty, insertion of balloon-expanded stents or release of self-expanding stents: An electron microscopic experimental study, Cardiovasc. Intervent. Radiol., 22, 56-61

HERLHEIN C., ZIMMERMANN M., METZ J., KUBLER W. (1995). Influence of surface texture and charge on the biocompatibility of endovascular stents, Coronary Artery Disease, 6 (7), 581-586

HONG M. K., BENYAR R., KORNOWSKI R., TIO F., BRAMWELL O., LEON M. B. (1997). Acute and chonic effects of self-exanding nitinol stents in porcine coronary arteries, Cor. Art. Diseas., 8, 45-48

HANSON S. R., SAKARIASSEN K. S. (1998). Blood flow and antithrombotic drug effects, Am. Heart J., 135, S132-S145

HOLMES D. R., BELL M. R., HOLMES D. R., et al. (1997). Interventional cardiology and intracoronary stents-a changing practice: approved vs. Nonapproved indications., Cathet. Cardiovasc. Diagn., 40, 133-138

HORBETT T. A. (1994). The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion, Colloids and Surfaces", B. Biointerfaces, 2, 225-236

JACOBS J. J., SKIPOR A. K., PATTERSON L. M., HALLAB J. (1998). Metal release in patient who have had a primary total hip arthroplasty, J. Bone Joint Surg., 80A(10), 1447-1458

JEONG M. H. (1996). Porcine Model of stent thrombosis : Platelets are the primary component of acute stent closure, Cath. Card. Diagn., 38, 38-43

JIA W., BEATTY M. W., REINHARDT R. A., HOFFMAN M. et al. (1999). Nickel release from orthodontic arch wires and cellular immune response to various nickel concentration, J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.), 48, 488-495

KAPILA S., REICHNOLD G. W., ANDERSON R. S., WATANABE L. G. (1991). Effects of clinical recycling on mechamical properties of nickel-titanium wires, Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 100(5), 428-435

KAPILA S., HAUGEN J. W., WATANABE L. G. (1992). Load-deflection characteristics of nickel-titanium alloy wire after clinical recycling and dry heat sterilization, Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 102(2), 120-126

KASEMO B., LAUSMAA J. (1988). J. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures, J. Biomed. Mater. Res., 22, 145-158

KEANE D., AZAR A. J., SERRUYS P.W., MACAYA C., COMLOMBO A., CREAN P. et al. (1995). On behalf of the BENESTENT investigators. Outcome following elective stent implantation in small coronary arteries, Eur. Heart J., 16, 335 (abstract)

KELLER J. C., DRAUGHN R. A., WIGHTMAN J. P. (1990). Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces, Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 5, 360

KILPADI D. V., LEMONS J. E. (1994). Surface energy characterization of unalloyed titanium implants, J. Biomed. Mater. Res., 28, 1419-1425

KILPADI D. V., RAIKAR G. N., LIU J., LEMONS J. E., GREGORY J. C. (1997). Effect of surface treatment on unalloyed titanium implants: spectroscopic analyses, J. Biomed. Mater. Res., 40, 646-659

KIMURA H., SOHMURA T. (1987). Surface coating on TiNi shape memory implant alloys, Osaka Univ. Dent. Sch., 27, 211-223

KOMATSU R., UEDA M., NARUKO T., KOJIMA A., BECKER A. E. (1998). Neointimal tissue responses at sites of coronary stenting in humans - Macroscopic, histological and immunohistochemical analyses, Circulation, 98, 224-233

LEE J. H., JEONG B. J., LEE H. B. (1997). Plasma protein adsorption and platelet adhesion onto comb-like PEO gradient surface, J. Biomedical, 34(1), 105-114

LEON M., BAIM D., POPMA J., et al. (1998). A clinical trial comparing three anti-thrombotic drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators, *New Engl. J. Med.*, 339, 1665-1671

MAKKAR R. R.,KAUL S., NAKAMURA M., DEV V., LITVACK F. I., PARK K. (1995). Modulation of acute stent thrombosis by metal surface characteristics and shear rate, Circulation, 92(8), I-86 (abstract)

MAKKAR R. R., EIGLER N. L., KAUL S., FRIMERMAN A., NAKAMURA M., FORRESTER J. S., LITVACK F. (1998). Effects of clopidogrel, aspirin and combined therapy in a porcine ex vivo model of high-shear induced stent thromobosis, Eur. Heart J., 10, 1538-1546

MERHI Y., KING M., GUIDOIN R. (1997). Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: Neutrophil, Platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions, J. Biomed. Mater. Res, 34, 477-485

MOORLEGHEM, W. V., CHANDRASEKARAN, M., REYNAERTS, D., PEIRS, J., BRUSSEL, H. V. (1998). Shape memory and superelastic alloys: The new medical materials with growing demand, Biomed. Mater. Res., 8, 55-60

NAKAYAMA Y. (1989). In vivo measurement of anodic polarization of orthopaedic implant alloys: comparative study of in vivo and in vitro experiments, Biomaterials, 10, 420-424

NAN H., PING Y., XUAN C., YONGXUAN L., GUANGIUN C. et al. (1998). Blood compatibility of amorphous titanium oxide films synthetized by ion beam enhanced deposition, Biomaterials, 19, 771-776

NYGREN H., ERICKSON C., LAUSMAA J. (1997). Adhesion and activation of platelets and polymorphonuclear granulocyte cells at TiO_2 surfaces, J. Lab. Clin. Med., 129, 35-46

OLLER A. R., COSTA M., OBERDOSTER G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds, Toxicol. Appl. Pharmacol., 143, 152-166

OTSUKA K., WAYMAN C. M. (1998). Mechanism of shape memory effect and superelasticity. In: Otuska K & Wayman CM (eds) Shape memory materials, Cambridge University Press, Cambridge, 27-48

DE PALMA V. E., BAIER R. E. (1972). Investigation of three-surface properties of several metals and their relation to blood biocompatibility, J. Biomed. Mat. Res., 3, 37-75

PEREZ-LUNA V. H. (1994). Developing correlation between fibrinogen adsorption and surface properties using multivariate statistics, J.Biomed. Matr. Res., 28, 1111-1126

RECHAVIA E., FISHBEIN M. C., DEFRANCE T., NAKAMURA M., EIGLER N. (1997). Temporary arterial stenting : Comparison to permanent stenting and conventional ballon injury in a rabbit carotid artery model, Cath. Cardiovasc. Diagn., 41, 85-92

RONDELLI G., VICENTINI B. (1999). Localized corrosion behaviour in simulated human body fluids of commercial Ni-Ti orthodontic wires, Biomaterials, **20**, 785-792

ROGERS C., EDELMAN E. R. (1995). Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis, Circulation, 91, 2995-3001

ROGUIN A., GRENADIER E., LINN S., BENYAR R. (1999). Continued expansion of the nitinol self-expanding coronary stent: Angiographic analyses and 1-year clinical follow-up, Am. Heart J., 138, 326-333

RYHANEN, J., NIEMI, E., SERLO, W., NIEMELA, E., SANDVIK, P., PERNU, H., SALO, T. (1997). Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures, J. Biomed. Mater. Res., 35, 451-457

RYHANEN J., KALLIOINEN M., NIEMELA E., SANDVIK P., SERLO W. (1998). *In vivo* biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy : Muscle and perineural tissue responses and encapsule menbrane thickness, J. Biomed. Mater. Res., 41, 481-488

SARKAR N. K., REDMOND W., SCHWANINGER B., GOLDBERG A. J. (1983). The chloride corrosion behaviour of four orthodontics wires, J. Oral Rehabil., 10, 121-128

DE SCHEERDER I., VERBEKEN E., VAN HUMBEECK J. (1998). Metallic surface modification, Semin. Interv. Cardiol., 3(3-4), 139-144

SCOTT N. A., ROBINSON K. A., NUNES G. L., THOMAS C. N., KING S. B. (1995). Comparison of the thrombogenicity of stainless steel and tantalum coronary stents, Am. Heart J., 129, 866-872

SCHOMIG A., NEUMANN F.J., KASTRATI A. et al. (1996). A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents, New Engl. J. Med., 334, 1084-1089

SEKIGUCHI Y. Application of shape memory alloys; Medical Applications. In: Funakubo H (ed.) Shape memory alloys, Volume 1. Gordon and Breach Science Publishers, New York, p 226-269

SERRUYS P. W., DE JAEGERE P., KIEMENEIJI F. et al. (1994). A comparison of balloon expendable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease, N. Engl. J. Med., 331, 489-495

SERRUYS P. W., STRAUSS B. H., BEATT K. J. et al. (1991). Angiographic follow up after placement of a self expanding coronary artery stent, N Engl J Med, 324, 13-17

SHETH S., LITVACK F., DEV V., FISHBEIN,M. C., FORRESTER J. S., EIGLER N. (1996). Subacute thrombosis and vascular injury resulting from slotted-tube Nitinol and stainless steel stents in a rabbit carotid artery model, Circulation, 94, 1733-1740

SHIN M. (1999). In vitro galvanic corrosion testing of tantalum, nitinol, and type 316L stainless steel stents, Society For Biomaterials, 25th annual meeting transactions, April28 May 2, Providence, pp479

SUNDGREN J. -E., BODO P., LUNDSTROM I., BERGGREN A., HELLEM S. (1985). Auger electron spectroscopic studies of stainless steel implants, J. Biomed. Mater. Res., 19, 663-671

SUTTON C. S., OKU T., HARASAKI H et al. (1988). Titanium-nickel intravascular endoprothesis: a 2-year study in dogs, AJR, 151: 597-601

SUTTON C. S., TOMINAGA R., HARASAKI H., EMOTO H., OKU T. et al. (1990). Vascular stenting in normal andatherosclerotic rabbit : studies of the intravascular endoprothesis of titanium-nickel alloy. Circulation, 81, 667-683

SUTTON C. S., CONSIGNY P. M., THAKUR M. (1994). Thrombogenicity of intravascular stent wires, Circulation, 90 (suppl I): I-9

SHABALOVSKAYA S., ANDEREG J. (1995). Surface spectroscopic characterization of NiTi equiatomic shape memory alloys for implants, J.Vac.Sci.Technol. **A, 13** (5)

SHABALOVSKAYA S., CUNNICK J., ANDEREEG J., HARMON B., SACHDEVA R. (1994). Preliminary data on in vitro study of proliferative rat spleen cell response to NiTi surfaces characterized using ESCA analysis," Proceeding of the International Conference on Shape Memory and Superelasticity, Pacific Grove, California, USA

SIEGERSTETTER V., KRAUSE T., HAAG K., OCHS A., MOSER H. E. (1997). Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) Thrombogenicity in stents and its effects on shunt patency, Acta radiologica, 38, 558-564

SILVAGGIO J., HICKS L. M. M. (1997). Effect of Heat Sterilization On the tortional properties of rotary nickel-titanium endodontic files, *Journal of endodontics*, **23**, 12, 731-734

SUNDGREN J.-E., BODO P., LUNDSTROM I. (1996). Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel, J. Colloid. Interface Sci., 110, 9-20

TABORELLI M., JOBIN M., FRANCOIS P., VAUDRAUX P., TONETTI M., S. SZMUCKLER-MONCLER, DESCOUT P. (1997). Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium, Clin. Oral Impl. Res., 8, 208-216

TAKESHITA F., TAKATA H., AYUKAWA Y., SUETSUGU T. (1997). Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol), Biomaterials, 18 (1)

The EPIC investigators(1994). Use of a monoclonal antibody directed against glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty, New Engl. J. Med., 3330, 956-961

The EPILOG investigators(1997). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization., New Engl. J. Med., 336, 1689-1696

TREPANIER C., TABRIZIAN M., YAHIA L'H, BILODEAU L., PIRON D. L. (1998). Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance, J. Biomed. Mat. Res., 43, 423-430

TREPANIER C., LEUNG T. K., TABRIZIAN M., YAHIA L'H., BIENVENU J.-G., TANGUAY J.-F., PIRON D. L., BILODEAU L. (1998). Preliminary Investigation of effects of surface treatments on biological response to shape memory NiTi stents, J. Biomed. Mater. Res., 43, 001-007

TRIGWELL S., SELVADURAY G. (1994). Effects of surface finish on the corrosion of NiTi alloy for biomedical application, " Proceeding of the International Conference on Shape Memory and Superelasticity, 383-388, Pacific Grove, California, USA

VEZEAU P. J., KOORBUCSCH G. F., DRAUGHN R. A., KELLER J. C. (1996). Effects of multiple sterilization on surface characteristics and *in vitro* biologic responses to titanium, J.Oral Maxillofac. Surg., 54, 738-746

VICHEV R. G., LIU Y., VAN HUMBEECK J., BLANPAIN B., CELIS J. P. (1997). Thermally grown oxide films on NiTi shape memory alloys," Proceeding of the 7th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA), Göteborg,

WAKHLOO A. K. , SCHELLHAMMER F., DE VRIES, SCHUMACHER M. (1994). Self Expanding and balloon-expandable stents in the treatment of carotid arteries: An experimental study in a canine model, AJNR, 15, 493-502

WALIVAARA B., ARONSSON B. O., RODAHL M., LAUSMAA J., TENGWALL P. (1994). Titanium with different oxides: *in vitro* studies of protein adsorption and contact activation, Biomaterials, 15 (10)

WANG J. Y.,WICKLUND B. H., GUSTILO R. B., TSUKAYAMA D. T. (1996). Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokynes by human monocytes/macrophages in vitro, Biomaterials, 17, 2233-2240

WATAHA J. C., LOCKWOOD P. E., MAREK M., GHAZI M. (1999). Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro, J. Biomed. Mater. Res., 45, 251-257

WEVER D. J., VELDHUIZEN A. G., SANDERS M. M., SCHAKENRAAD J. M. , VAN HORN J. R. (1997). Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy, Biomaterials, 18