

Impact des nanotechnologies sur les dispositifs médicaux

Arnaud Pallotta

▶ **To cite this version:**

Arnaud Pallotta. Impact des nanotechnologies sur les dispositifs médicaux. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931993

HAL Id: hal-01931993
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931993

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 13 juillet 2017, sur un sujet dédié à :

Impact des nanotechnologies sur les dispositifs médicaux

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Arnaud PALLOTTA

né le 27 Mars 1988

Membres du Jury

Président :	Igor CLAROT,	Professeur des Universités.
Juges :	Ariane BOUDIER,	Maître de Conférences des Universités,
	Dominique DECOLIN,	Maître de Conférences des Universités,
	Anthony PUZO,	Pharmacien,
	Juliana TOURNEBIZE,	Pharmacien.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Béatrice FAIVRE
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Conseil de la Pédagogie
Président, Brigitte LEININGER-MULLER
Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier
Président, Béatrice DEMORE
Commission Prospective Facultaire
Président, Christophe GANTZER
Vice-Président, Jean-Louis MERLIN
Commission de la Recherche
Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable Pharma Plus ENSGSI	Igor CLAROT
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Jean-Claude BLOCK
Max HENRY
Alain MARSURA
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique et Epidémiologie*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Igor CLAROT	*85*	*Chimie analytique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique, Audioprothèse*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Eau, Santé, Environnement*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Alexandre HARLE	*82*	*Biologie cellulaire oncologique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*
François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*

Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86/01*	*Droit en Santé*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Marianne PARENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Guillaume SAUTREY	*85*	*Chimie analytique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Sabrina TOUCHET	*86*	*Pharmacochimie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Ð d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Ð d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Ð de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Ariane Boudier

C'est un grand honneur que tu ais accepté d'être ma directrice de thèse et surtout que tu ais réussi à me supporter durant la correction du manuscrit ! Je me souviens du tout premier rapport de stage que j'ai rédigé et où dans les remerciements je disais « si dans l'avenir je faisais de la recherche ce serait sûrement grâce à toi ». Et bien voilà c'est chose faite, il ne reste plus qu'à continuer comme ça !

Igor Clarot

Merci d'avoir accepté d'être président de ma thèse d'exercice en plus d'être déjà le directeur de mon doctorat de Sciences. Je sais que cela représente une charge de travail dont tu te serais bien passé, même si au fond tu adores présider des jurys et surtout réaliser tout le travail administratif qui va de pair !

Juliana Tournebize

Merci à toi d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse d'exercice. Cela me fait très plaisir, après plusieurs années, de pouvoir échanger de nouveau avec toi sur le thème des Sciences.

Anthony Puzo

Des bancs de la faculté à ceux d'un jury de thèse en passant par la direction d'une association grandiose, il n'y a qu'un pas que tu as bien voulu franchir ! Qui sait quel sera le prochain et qui le fera, mais j'espère de tout cœur qu'il y en aura un ! (Au pub ou ailleurs)

Dominique Decolin

Merci pour les conseils que tu as pu me donner lors des TP de chimie analytique, toutes les discussions techniques faisant appel à des notions d'une difficulté inimaginable (ici je parle évidemment de recettes de pâtisserie) et enfin merci pour ton soutien face aux étudiant(e)s !

Sarah

Merci pour tout, maintenant que j'ai ouvert la voie, c'est à ton tour de te lancer !

Pierre Leroy

Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire durant toutes mes années à la faculté de pharmacie. N'hésitez pas à venir vous assoir pour discuter quand vous en avez envie.

A toute l'équipe de l'EA 3452, je tiens à vous remercier pour votre bonne humeur (quasi) quotidienne, ainsi qu'à l'aide apportée tout au long de mon travail. Mention spéciale à Justine, qui a su (à grand coup de moqueries) me faire avancer dans la rédaction.

A tous mes amis, de Nancy ou d'ailleurs, que vous soyez du domaine médical, scientifique, bancaire, agricole ou autres. Ce travail marque la fin d'une époque, sans pour autant signifier un changement radical. La bière sera toujours fraiche et vous serez toujours les bienvenus pour la déguster.

A tous les étudiants (qui par le plus grand des hasards tombaient sur ce travail), je voulais vous dire que mener un doctorat d'université et une thèse de pharmacie de front n'était pas incompatible. Cela reste une aventure et comme dans toute aventure il y a des moments difficiles, mais la satisfaction obtenue vaut bien toutes les peines du monde !

A tous ceux que j'oublie, sachez que je ne vous oublie pas pour autant.

TABLE DES MATIERES

I Introduction générale 1

II Définitions réglementaires 4

1. Dispositifs médicaux 5

1.1. Définition et classification 5

1.2. Mise sur le marché et matériovigilance 6

2. Dispositifs médicaux implantables 8

3. Biocompatibilité des DMI et phénomènes de surface 9

3.1. Définition de la biocompatibilité 9

3.2. Tests employés pour démontrer la biocompatibilité 10

3.3. Importance des phénomènes de surface dans la biocompatibilité 11

III Apport des nanotechnologies dans le domaine du DM 12

1. Terminologie employée 13

2. Caractérisation physico-chimique 16

2.1. Paramètres physiques 17

2.2. Paramètres chimiques 20

3. Particularité de la dimension nanométrique 22

3.1. Effets de surface dominants 22

3.2. Agglomération et agrégation 22

3.3. Taille et propriétés mécaniques 23

3.4. Nanomatériaux et échelle biologique 23

4. Nanomatériaux et systèmes biologiques 25

4.1. Interaction avec les protéines et ses conséquences 25

4.2. Aspects pharmacocinétiques 29

5. Connaissances sur la toxicité des nanomatériaux 31
5.1. Débris et usure des DM 32
5.2. Nanotubes de carbone 32
5.3. Nanoparticules d'argent 33
IV Dispositifs médicaux et nanomatériaux 35
1. Dispositifs non implantables 39
1.1. Aiguilles 39
1.2. Soins des plaies 40
1.3. Cathéters 40
1.4. Chirurgie 41
1.5. Diagnostic et surveillance 41
2. Dispositifs implantables 42
2.1. Greffons synthétiques 42
2.2. Stents 42
2.3. Orthopédie 44
2.4. Autres dispositifs implantables 44
2.5. Cancérologie 46
2.6. Nanorobots en développement 47
Partie expérimentale 51
V Etat de l'art 52
1. Maladies cardiovasculaires et ischémiques 53
2. Stents nus et stents actifs 54
3. Resténose et donneurs de monoxyde d'azote 55
4. Stratégie de fonctionnalisation de la surface des stents 57
5. Objectif du projet 59
VI Matériel et méthodes 62

1. Réactifs et étalons....63
2. Préparation des films....63
3. Caractérisation des films....65
3.1. Stabilité....65
3.2. Microscopies....65
3.3. Electrophorèse capillaire de zone....65
3.4. Quantification de l'or....66
3.5. Profil antioxydant et biocompatibilité des films....67
4. Statistiques....70
VII Résultats....71
1. Préparation et caractérisation des films....72
1.1. Caractérisation physico-chimique....73
1.2. Stabilité des films....78
2. Comportement biologique des films....79
2.1. Profil antioxydant....79
2.2. Adsorption de protéines....80
2.3. Interaction avec des monocytes humains....80
2.4. Interaction avec du plasma....81
2.5. Interaction avec le sang....83
3. Stents....83
VIII Discussion Générale....85
IX Conclusion....91
X Bibliographie....94

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Modalité d'évaluation de la conformité des DM. AQ : Assurance Qualité. CE : Communauté Européenne. (Adapté selon (3-5)) 7

Figure 2 : (A) Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de nanoparticules d'argent ou d'or de formes différentes selon (11). (B) Représentation en trois dimension d'un nanotube de carbone. (C) Image en microscopie électronique à transmission (MET) d'une nanofibre de dioxyde de zyrconium selon (12). (D) Image en MEB d'un nanofilm de magnésium selon (13). (E) Image en MET d'un nanofilm polymérique selon (14)..... 15

Figure 3 : Exemple de diverses pointes utilisables en AFM observées en MEB. 18

Figure 4 : Visualisation du diamètre hydrodynamique d'une nanoparticule. Dc : diamètre de cœur. Dh : diamètre hydrodynamique. DLS : Diffusion dynamique de la lumière. MET : microscopie électronique à transmission. 19

Figure 5 : Effet Vroman : la nature des protéines adsorbées à la surface d'une nanoparticule est modifiée au cours du temps. (1) liaison non spécifique des protéines de faible affinité en grande quantité. (2) état d'équilibre entre protéines de faible et forte affinité. (3) liaison des protéines de forte affinité. (36) 26

Figure 6 : Distribution des nanomatériaux incorporés dans des DM selon (43). Voies confirmées (flèches pleines) ou hypothétiques (pointillées). SNC : système nerveux central. 29

Figure 7 : Visualisation en MEB du système de microaiguilles « Micropyramid™ » de NANOPASS TECHNOLOGIES. Chaque pointe d'aiguille est constituée de cristaux de silicone purs. (×1500). www.nanopass.com 39

Figure 8 : Schéma de principe de l'électrospinning selon (80) 42

Figure 9 : Formule générale des polyphosphazènes 43

Figure 10 : Visuel du cœur artificiel développé par CARMAT (http://www.carmatsa.com) . 45

Figure 11 : Visuel du rein artificiel développé par l'Université de Californie (http://www.pharm.ucsf.edu/kidney) 46

Figure 12 : Exemple de stents. A : stent dit « tressé » en alliage Nitinol® (nickel-titane) de la société Nimesis. B : stent en acier inoxydable obtenu par découpe laser. 53

Figure 13 : Schématisation des différentes étapes conduisant à la resténose. 55

Figure 14 : Schématisation de la méthode de fabrication d'un film multicouche (selon (Decher-1997)). 58

Figure 15 : Schéma de la libération d'un principe actif piégé dans un film multicouche. (selon (108)). 59

Figure 16 : Processus de fabrication des films multicouches de polyélectrolytes piégeant des nanoparticules d'or. 64

Figure 17 : (A) Aspect des lames en fonction du nombre de cycles de nanoparticules d'or déposés, (B) Spectre visible d'AuNP en suspension et de films composés d'1 à 3 cycles, (C) Absorbance à la longueur d'onde maximale des films en fonction du nombre de cycles déposés, n = 3. 72

Figure 18 : Images en MET (A) des AuNP en suspension, (B) d'un film composé d'un cycle (C) et de trois cycles. 73

Figure 19 : Images réalisées en AFM. (A) Vision en 3 dimensions de films composés de 20 couches de polymères (gauche) sans AuNP et (droite) avec AuNP. (B) en fonction de la couche la plus externe (gauche vision en 2 dimensions et droite vision en 3 dimensions) (1) *PAH*, (2) *PAA*, (3) *AuNP*.....75

Figure 20 : Electrophorégramme de l'alcool benzylique en fonction de l'état de surface du capillaire. Layer 1 correspond à une couche de PAH, layer 2 [PAH-AuNP] et layer 3 [PAH-AuNP-PAA].....77

Figure 21 : Evolution du FEO au sein d'un capillaire en fonction du nombre de cycles déposés. Le nom de chaque point correspond à la dernière couche déposée. 78

Figure 22 : Interaction entre les films dont la dernière couche varie et (A) le radical $ABTS^{\bullet+}$ dont la décoloration est suivie par spectrophotométrie à 734 nm ou (B) le GSH dont la concentration est mesurée par la réaction d'Ellman à 412 nm, n = 3. 79

Figure 23 : Adsorption (A) du fibrinogène (2 g/L) suivie par la réaction au BCA et (B) de la BSA (40 g/L) suivie par spectrofluorimétrie, à la surface des films, n = 3. 80

Figure 24 : Mesure de la quantité d'ARN pour (A) *ncf*-1 et (B) *il*-1β présente dans les monocytes humains (lignée THP-1-ATCC®-PIB-202™), n = 3 * $p < 0{,}0001$ *vs* contrôle - . 81

Figure 25 : Electrophorégrammes du temps de migration de l'alcool benzylique après injection de plasma de rat dilué. 82

Figure 26: Pourcentage d'hémolyse obtenu après incubation des films multicouches dans du sang de rat dilué. n = 9 ;* $p < 0{,}0001$ *vs* contrôle - ; • $p < 0.0002$ *vs* contrôle -. 83

Figure 27 : Observations réalisées en MEB et AFM d'un stent nu et puis d'un stent recouvert de 20 couches de polymères et AuNP.....84

Table 1 : Liste des différents DM incorporant des nanotechnologies 37

Table 2 : Récapitulatif des essais cliniques intégrant des nanoparticules et des DM (extrait à partir du site internet clinicaltrials.gov).....49

Table 3 : Séquences des amorces de gènes utilisées pour la qRT-PCR.....69

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2, 2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	*Atomic force microscopy*
AgNP	Nanoparticules d'argent
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
AQ	Assurance qualité
ARN	Acide ribonucléique
AuNP	Nanoparticules d'or
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine sérique bovine
CE	Communauté européenne
CML	Cellules musculaires lisses
Dc	Diamètre de cœur
DES	*Drug eluting stent*
Dh	Diamètre hydrodynamique
DLS	*Diffraction light scattering*
DM	Dispositif médical
DM-DIV	Dispositif médical de diagnostic *in vivo*
DMI	Dispositif médical implantable
DMIA	Dispositif médical implantable actif
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
FEO	Flux électroosmotique
GSH	Glutathion
HR	*Hemolysis ratio*
ICP-MS	Torche à plasma couplée spectrométrie de masse
INVS	Institut national de veille sanitaire
ISO	Organisation internationale de normalisation
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
NO	Monoxyde d'azote
NP	Nanoparticules
NTC	Nanotubes de carbone
PA	Principe actif
PAA	Acide poly(acrylique)
PACA	poly(cyanoacrylate d'alkyle)
PAH	Chlorhydrate de poly(allylamine)
PBS	Tampon phosphate salin
PDMA	*N,N*-diméthylacrylamide
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEO	Poly(éthylène oxyde)
PMA	Phorbol myristate acétate
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
RSNO	*S*-nitrosothiols
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SNC	Système nerveux central
TMN	Temps de migration du neutre

I INTRODUCTION GENERALE

Dans le monde pharmaceutique, on distingue deux catégories majoritaires de produits : les médicaments et les dispositifs médicaux (DM). Les deux obéissent à des règles bien précises d'autorisation de mise sur le marché (AMM) qui diffèrent en fonction de leur qualité : médicament ou DM. Le marché des DM comporte des produits très variés mais aussi fort nombreux. Le nombre de produits commercialisés en France se situerait entre 800 000 et 2 millions de références. (1) Il existe plusieurs classes de DM, allant des dispositifs externes comme les chaises roulantes, pansements … jusqu'à des dispositifs plus compliqués pouvant être stériles et/ou implantables tels que les aiguilles, ciments chirurgicaux ou implants osseux. Ces derniers représentent une part très importante des DM délivrés. En France, entre 2010 et 2016, on dénombre plus de 17 000 DM stériles à visée implantable, ce qui représente près de 50 % de l'ensemble des DM de classe II ou supérieure (cette classification sera détaillée ci-après).

Avec l'accroissement du développement et de la commercialisation des DM implantables (DMI) se posent des problèmes de biocompatibilité ainsi que de tolérance à long terme de ces dispositifs. Des solutions ont été envisagées et commercialisées, notamment avec la création de DMI capables de libérer des principes actifs ou d'avoir une activité au sens large (impulsion électrique, délivrance de médicaments, stimulateurs …), formant ainsi la classe des DMI actifs (DMIA). Actuellement sur le marché, on estime à plus de 1 000 le nombre de DMIA commercialisés, toute visée confondue (Source ANSM – 2017 (2)), ce qui représenterait environ 2 % des DMI. Cependant, on remarque une nette augmentation de la mise sur les marché des DMIA, car près de 65 % de ces derniers ont été commercialisés après 2010. On peut donc s'attendre à un accroissement important du nombre de dispositifs médicaux actifs en circulation dans les années à venir.

Malgré l'intérêt que suscitent les DMIA, certaines études ont montré l'incapacité à long terme de ces DMIA à maintenir leur bonne intégration au sein des tissus sans entrainer d'effets secondaires. Aujourd'hui, pour palier à ce problème, les chercheurs se tournent de plus en plus vers les nanotechnologies. En effet, la diminution extrême de la taille d'un matériau (de l'ordre de 10^{-9} m) lui apporte des propriétés nouvelles pouvant être exploitées pour améliorer, modifier ou moduler le comportement d'un DM vis-à-vis de son environnement biologique.

Ce travail comprend deux grandes parties. Une première partie à caractère bibliographique qui reprend les principales définitions des DM ainsi que des nanotechnologies et fait le point sur l'impact actuel des nanotechnologies sur les DM ainsi que les principales applications de celles-ci. Dans une deuxième partie expérimentale, sont abordés en détail le développement et la mise en place d'un revêtement constitué d'un film de polymères intégrants des nanoparticules d'or (AuNP) pour le recouvrement de stent. Le but est de créer à terme un stent capable grâce à cette nanostructuration, de libérer des principes actifs pour augmenter la biocompatibilité de ce dernier, limiter les survenues d'effets secondaires tels que la resténose (cause majoritaire d'intervention chirurgicale après la pose d'un stent et définie comme une diminution de plus de 50 % du diamètre initial du vaisseau) et d'améliorer la qualité de vie générale du patient après la chirurgie.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire « Cibles Thérapeutiques, Formulation et Expertise Pré-clinique du Médicament », CITHEFOR, Equipe d'Accueil, EA, 3452 de la Faculté de Pharmacie de Nancy (Université de Lorraine). L'activité de recherche du laboratoire est centrée sur les Sciences du Médicament avec pour axe principal unique : « Molécules innovantes et nanoformulations de donneurs de monoxyde d'azote appliquées au système vasculaire ». Les travaux inclus dans cette activité de recherche s'inscrivent dans un projet intitulé « NaNOGOLF » qui s'intéresse à la nanostructuration de surface de DM par des nanoparticules d'or pouvant être fonctionnalisées par des principes actifs et enchâssées dans des films de polymères.

II DEFINITIONS REGLEMENTAIRES

1. Dispositifs médicaux

1.1. Définition et classification

Les DM sont des produits de santé au même titre que des médicaments mais leur action qu'elle soit thérapeutique ou diagnostique n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques, immunologiques ni par métabolisme. Cela les distingue de la définition des médicaments. (Article L.5111-1 du Code de la Santé Publique)

Les DM sont définis par la Directive Européenne ; directive 93/42/CEE (3) comme étant « tout instrument, appareil, équipement, logiciel, matière ou autre article, utilisé seul ou en association, y compris le logiciel destiné par le fabriquant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostique et /ou thérapeutique, et nécessaire au bon fonctionnement de celui-ci. Le dispositif médical est destiné par le fabriquant à être utilisé chez l'Homme à des fin de :

- Diagnostic, prévention contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie,
- Diagnostic, contrôle, traitement d'atténuation ou de compensation d'une blessure ou d'un handicap,
- D'étude ou de remplacement ou modification de l'anatomie ou d'un processus physiologique,
- Maîtrise de la conception,
- Et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. » (3, 4).

Les dispositifs médicaux sont classés en quatre catégories selon leur niveau de risque potentiel pour la santé :

- Classe I (risque le plus faible) : lunettes, véhicules pour personnes handicapées…
- Classe IIa (risque potentiel modéré) : lentilles de contact, appareils d'échographie…
- Classe IIb (risque potentiel élevé) : préservatifs, produits désinfectants…
- Classe III (risque élevé) : prothèses mammaires, endoprothèses vasculaires ou stents, prothèses de hanche…

Cette classification a pour objectif d'assigner un niveau de risque à chaque DM afin de lui affecter des règles d'évaluation et de contrôle proportionnelles à ce niveau de risque. La classification des DM repose d'une part sur des règles générales basées sur leurs caractéristiques (en fonction de la durée d'utilisation, du type de dispositif …) et d'autre part sur des règles spécifiques s'appliquant à certaines familles de DM. Si plusieurs règles s'appliquent, c'est la classification la plus élevée qui est retenue.

Pour déterminer l'appartenance à une de ces classes, le fabriquant s'appuie sur les 18 règles applicables définies par l'annexe IX de la directive 93/42/CEE (3)(Annexe 1). Ces règles reposent sur 3 critères :

- la durée d'utilisation définie comme :
    - temporaire : le DM est utilisé en continu pendant moins de 60 minutes ;
    - court terme : le DM est utilisé en continu pendant 30 jours au maximum
    - long terme : le DM est utilisé en continu pendant plus de 30 jours.
- le type de dispositif,
- la sphère d'intervention.

Il convient au fabriquant, en fonction de ces règles, de déterminer le caractère non invasif, invasif ou actif du DM. A l'aide de ces trois éléments et d'autres critères particuliers définis par l'annexe IX (comme la présence d'une substance médicamenteuse, la fabrication à partir de tissus animaux, l'émission de rayonnements ionisants …), le fabriquant déterminera la classe du dispositif médical.

1.2. **Mise sur le marché et matériovigilance**

Avant la mise sur le marché d'un DM le fabriquant doit soumettre son produit à une procédure d'évaluation de la conformité, par rapport aux exigences essentielles, prévue dans la directive applicable afin de pouvoir y apposer le marquage CE. Les textes légaux de référence pour l'évaluation de la conformité (Figure 1) sont décrits aux annexes directives :

- DM : directive 93/42/CEE – Annexes II, III, IV, V, VI, VII
- Dispositifs médicaux implantables actifs (DMIA) : directive 90/385/CEE – Annexes 2, 3, 4, 5
- Dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DM-DIV) : directive 98/79/CE – Annexe III

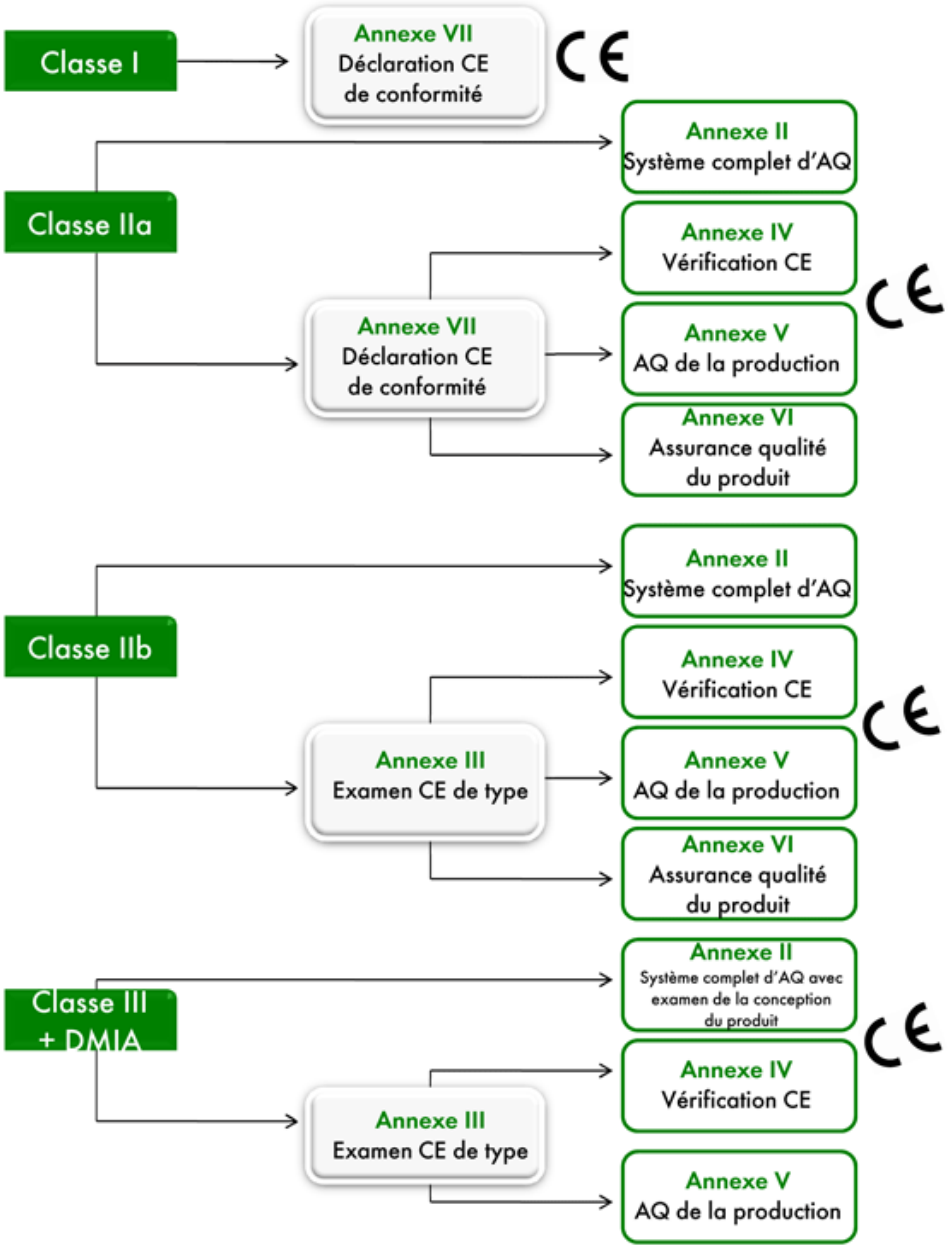


Figure 1 : Modalité d'évaluation de la conformité des DM. AQ : Assurance Qualité. CE : Communauté Européenne. (Adapté selon (3-5))

Chaque directive décrit les différentes procédures d'évaluation de la conformité possible, le but étant d'apporter un niveau de protection nécessaire en fonction du risque associé au DM. Bien évidemment, plus la classe du DM sera élevée, plus les critères de conformité relatifs à celui-ci seront sévères.

Afin de maitriser les risques liés au DM, les fabricants doivent avoir mis en place un système leur permettant d'assurer une surveillance après la commercialisation : la matériovigilance. Celle-ci repose sur l'article 8 de la directive 2007/47/CE (4). Elle a pour objectif d'éviter que ne se produise des incidents et risques d'incidents graves mettant en cause des dispositifs médicaux.

2. Dispositifs médicaux implantables

Parmi les DM, une large part des dispositifs correspondent à des dispositifs médicaux implantables (DMI). Est considéré comme dispositif implantable, un dispositif implanté en totalité dans le corps humain ou destiné à remplacer une surface épithéliale ou la surface de l'œil. L'implantation se fait grâce à une intervention chirurgicale et le dispositif reste en place après l'intervention.

Les DMI appartiennent de ce fait essentiellement aux classes IIb et III c'est-à-dire aux classes qualifiée à « haut risque ».

Parmi ces DMI, on trouve une classe à part, appelée les DMI actifs (DMIA). Les DMIA sont généralement des dispositifs à risque élevé soumis à des normes et à des définitions rigoureuses avant leur commercialisation sur les marchés mondiaux. La directive 90/385/CEE (5) réglemente l'aptitude à la mise sur le marché et les paramètres de service applicables aux DMIA. Pour répondre aux exigences réglementaires de la directive, un produit doit être conforme à la définition d'un DMIA, à savoir un dispositif médical à la fois « actif » (stimulation électriques, délivrance de médicaments, …) et « implantable ». L'extrait de la directive sur les DMIA les définit comme « tout dispositif médical actif destiné à être totalement ou partiellement introduit, par voie chirurgicale ou médicale, dans le corps humain, ou par une intervention médicale dans un orifice naturel et qui est destiné à y demeurer après l'intervention ». Cette définition peut s'appliquer à l'ensemble du système ou à des pièces interchangeables destinées à former un système (en association avec d'autres dispositifs). Dans pareils cas, chaque partie appartenant à un système est couverte par la Directive, qu'il s'agisse ou non d'une partie elle-même « active » ou « active et implantable ».

Quelques exemples de DMIA :

- Stimulateurs : vessie, sphincter, diaphragme, neurostimulateurs implantables, …
- Implants cochléaires,
- Dispositifs d'administration de médicaments actifs implantables (pompe à insuline),
- A visée cardiovasculaire : stimulateurs cardiaques implantables, défibrillateurs implantables, endoprothèses ou stents actifs …
- Autres : câbles, électrodes et adaptateurs pour stimulateurs cardiaques, programmateurs, logiciels et tous les accessoires de transmission vers un dispositif actif et implantable…

Depuis 2010, le nombre de DMIA mis sur le marché ne cesse d'augmenter. On peut donc s'attendre à un accroissement important du nombre de dispositifs médicaux actifs en circulation dans les années à venir.

3. Biocompatibilité des DMI et phénomènes de surface

Il est important de noter qu'une grande majorité des DMI et DMIA a pour vocation à se retrouver dans le corps humain à plus ou moins long terme. Il est donc nécessaire de s'assurer que ces derniers n'engendreront pas d'effets secondaires délétères à long terme. C'est pour s'assurer de cette innocuité qu'il est nécessaire de les rendre « biocompatibles ».

3.1. Définition de la biocompatibilité

Le préfixe « bio-» se retrouve dans de plus en plus de produits du quotidien de consommation courante, des yaourts jusqu'au carburant des voitures. Cette mode provient d'une absence de définition de chacun des néologismes. Ce n'est pas le cas de la biocompatibilité qui a fait l'objet d'une conférence de consensus et dont l'évaluation suit une norme ISO (l'Organisation Internationale de Normalisation). La définition donnée par la norme ISO 10-993 (6) est la suivante : « La biocompatibilité est la capacité d'un biomatériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte ». Un biomatériau est un matériau non vivant utilisé dans un DM, à des fins thérapeutiques ou non, et appelé à interagir avec les systèmes biologiques. Selon cette définition, une greffe n'est donc pas un biomatériau.

Pendant des années, la biocompatibilité a été synonyme d'inertie, c'est-à-dire qu'un matériau ne posant aucun problème biologique était considéré comme biocompatible. En fait, selon cette définition, la biocompatibilité est différente de la tolérance à un matériau car elle suppose une réponse appropriée de l'hôte. L'or, peut être défini comme un matériau biocompatible ou non en fonction du but dans lequel il est employé : il est considéré comme biocompatible s'il est utilisé pour une restauration dentaire. Il ne l'est pas s'il est employé comme implant orthopédique car il n'induit pas, *a contrario* du titane, d'ostéointégration. Un autre exemple peut être donné : un DMI à visée cardiovasculaire ne doit pas entrainer une agrégation de plaquettes et la formation d'un caillot sur la surface exposée au flux sanguin pour être qualifié de biocompatible.

3.2. Tests employés pour démontrer la biocompatibilité

La biocompatibilité englobe toutes les réponses de l'organisme à la mise en place d'un matériau, elle ne peut donc pas être évaluée par un test unique, qui ne permet au mieux que l'évaluation d'une seule de ses facettes. La biocompatibilité doit être évaluée par une série de tests donnés par la norme ISO 10-993 (6). Celle-ci est valable uniquement pour les DM, quel que soit le domaine d'application médicale, et ne donne que des directives générales. Il y est donc spécifié que le protocole, la réalisation et l'interprétation des résultats doivent être confiés à des spécialistes.

Les biomatériaux sont classés en classe I, IIa, IIb et III en fonction de la durée et de la nature du contact ainsi que de l'origine chimique du matériau (*e.g.* métallique). En fonction de ce classement, les biomatériaux n'auront pas à subir les mêmes tests pour démontrer leur biocompatibilité (tests d'hémocompatibilité, de génotoxicité, de neurotoxicité …)

Il existe une chronologie des tests réalisés :

- Essais primaires :
    - *In vitro* : essais de cytotoxicité, de génotoxicité et d'hémolyse,
    - *In vivo* : essais de cancérogénicité, reproduction et toxicité systémique,
- Essais secondaires *in vivo* : essais d'irritation muqueuse, cutanée, de sensibilisation et d'implantation,

- Essais d'utilisation chez l'animal, dans les conditions normales d'utilisation du biomatériau (*e.g.* implantation d'un stent intra-coronaire chez le cochon afin d'évaluer le taux de resténose – diminution *de novo* de la lumière du vaisseau- induit par le DM),
- Essais cliniques chez l'Homme.

3.3. Importance des phénomènes de surface dans la biocompatibilité

Les exemples cités montrent que la biocompatibilité dépend grandement du matériau mais aussi de la façon qu'il a d'interagir avec les tissus dans lesquels il se trouve durant toute la durée de son implantation dans l'organisme. Les différentes interactions possibles entre un DMI et un tissu se faisant à l'interface matériau/tissu, sa composition superficielle ainsi que son état de surface sont des points clés pouvant influencer la biocompatibilité finale du matériau.

Depuis un peu plus d'une vingtaine d'année, une part importante de la recherche s'emploie à modifier les caractéristiques de surface de divers biomatériaux afin d'en améliorer leur biocompatibilité. On peut citer comme exemples le dépôt d'un film d'hydroxyapatite à la surface d'un implant pour améliorer son affinité vis-à-vis des ostéoblastes (7), la microstructuration de la surface d'implants en titane pour modifier leur interaction avec les protéines sanguines et favoriser l'adhésion cellulaire (8).

Enfin, pour améliorer encore plus la biocompatiblité, les phénomènes de surface et/ou les propriétés surfaciques d'un objet implantable, les chercheurs se penchent de plus en plus vers les nanotechnologies. L'utilisation de nanoparticules ou de la nanostructuration de surface peut grandement améliorer ou modifier les capacités d'un DM.

III APPORT DES NANOTECHNOLOGIES DANS LE DOMAINE DU DM

Dans ce chapitre, nous reviendrons sur les définitions faisant consensus dans les nanotechnologies, ainsi que les différentes particularités apportées par le monde nanométrique sur les propriétés du matériau.

1. Terminologie employée

La définition communément admise au sein de la communauté scientifique désigne une nanoparticule comme un matériau à l'échelle nanométrique, celle dont au moins une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm. Cette caractéristique apporte aussi la notion de nouvelles propriétés chimiques, physiques et biologiques, qui sont spécifiques à cette taille (9, 10). Il est à noter qu'il n'y a pas encore de consensus international clair en termes de terminologie à l'heure actuelle :

- Echelle nanométrique : D'après les définitions de ISO/TS 80004-2 de 2015 (15), cette échelle désigne la gamme de tailles allant environ de 1 à 100 nm (9, 10). La taille inférieure a été introduite pour éviter qu'un atome ou un petit groupe d'atomes ne soient considérés comme des nano-objets. De la même façon, certains nano-objets ont une taille dépassant les 100 nm car leurs caractéristiques diffèrent du même matériau à une échelle macroscopique.
- Nanotechnologie : désigne la manipulation et le contrôle des matériaux et de leurs procédés à l'échelle nanométrique, pour exploiter les phénomènes et propriétés liés à cette dimension. La nanotechnologie inclut la synthèse de ces matériaux. Ceci implique donc la fabrication de structures, de dispositifs et de systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière à l'échelle nanométrique.
- Nanomatériaux :
    - Au sein des nanotechnologies, les nanomatériaux occupent une place prépondérante. Ce sont des matériaux dont au moins une des dimensions externes est à l'échelle du nanomètre (incluant des nano-objets ou possédant une surface/structure interne à l'échelle nanométrique (voir : matériaux nanostructurés)) et présentent une ou plusieurs nouvelles caractéristiques chimiques, physiques ou biologiques spécifiques.
    - Il peut être utile de différencier les nanomatériaux naturels ou non intentionnels de ceux manufacturés. Les **nanomatériaux manufacturés** sont fabriqués par l'Homme dans un cadre de recherche ou industriel. Par contre,

les **nanomatériaux naturels** peuvent être des nanoparticules ou bien des agrégats à l'échelle nanométrique provenant du cosmos, des volcans, des incendies, de certains minéraux comme le quartz ou encore de la dégradation du squelette des animaux ou des végétaux (graphène). Enfin, les **nanomatériaux non intentionnels**, sont eux d'origine humaine et désignent les polluants atmosphériques (particules « fines ») dues à l'émission automobile, les fumées d'usine, …

- Enfin, on peut citer les **matériaux nano-renforcés**, qui incorporent dans leurs matrices des nano-objets qui apportent une nouvelle fonction ou modifient les propriétés mécaniques, optiques, magnétiques ou thermiques du matériau. C'est le cas, par exemple, des nanocomposites qui sont utilisés pour renforcer la résistance à l'usure dans des utilisations de renforts (intégration de nanoparticules de dioxyde de silicium, SiO_2, pour renforcer les fibres de carbone des raquettes de tennis).

- Matériaux nanostructurés : un matériau nanostructuré est un matériau qui possède une structure de surface ou interne de l'ordre du nanomètre et qui présente ainsi des propriétés chimiques, physiques ou encore biologiques propres à cette échelle. Par exemple, une surface présentant des pores de taille nanométrique est considérée comme une nanostructuration. Il est possible de nanostructurer les surfaces des matériaux par incision laser, lithographie, inclusion de nanoparticules ou par un revêtement d'épaisseur nanométrique. Ils sont généralement obtenus par dépôts physique ou chimique (plasma, électrochimie, ablation laser …).
- Nano-objet : la morphologie des nano-objets est variée, mais ils possèdent tous une, deux ou trois de leur dimension externe à l'échelle nanométrique. Une **nanoparticule** est un nano-objet dont les trois dimensions externes sont comprises dans l'intervalle 1 à 100 nm. Elles ne sont pas forcément sphériques mais peuvent avoir des formes variées (aiguilles, bâtonnets, étoiles…) (Figure 2). Les nano-objets avec seulement deux dimensions dans l'intervalle sont par exemple des **nanofibres**, des **nanotubes** ou des **nanofilaments** (nanotubes de carbone (NTC)). Enfin, ceux ne présentant qu'une seule dimension à l'échelle nanométrique sont classiquement des **nanofilms**, ou des **nanorevêtements**.

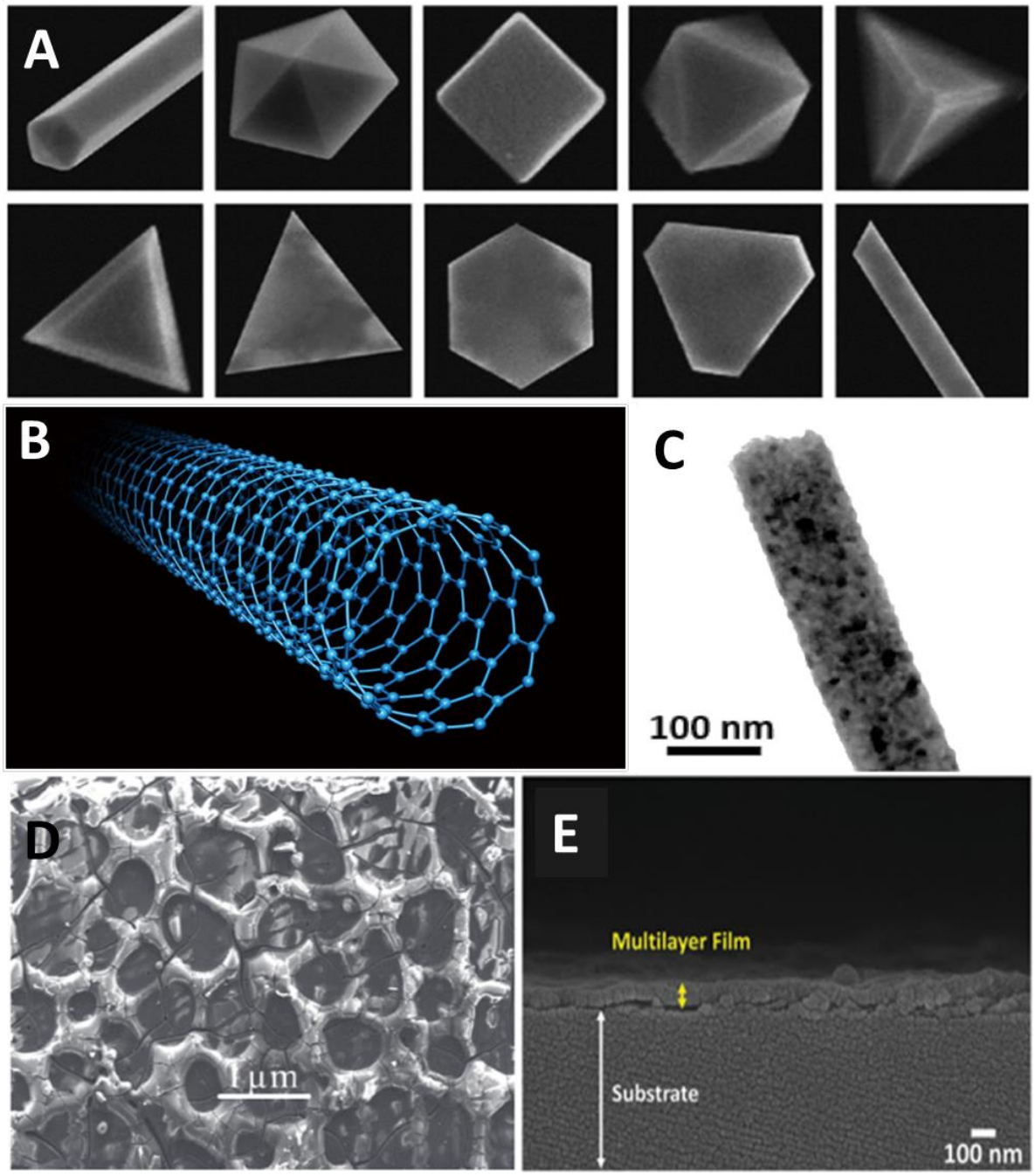


Figure 2 : (A) Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de nanoparticules d'argent ou d'or de formes différentes selon (11). (B) Représentation en trois dimension d'un nanotube de carbone. (C) Image en microscopie électronique à transmission (MET) d'une nanofibre de dioxyde de zyrconium selon (12). (D) Image en MEB d'un nanofilm de magnésium selon (13). (E) Image en MET d'un nanofilm polymérique selon (14).

2. Caractérisation physico-chimique

L'impact des nanotechnologies sur l'être humain et ses systèmes biologiques reste encore mal connu. Il est donc nécessaire d'avoir une caractérisation précise de ces objets pour déterminer leur comportement biologique. Pour cela, connaitre la composition chimique et mesurer la taille des nanoparticules sont des facteurs nécessaires mais pas suffisants pour caractériser un nanomatériau. D'autres éléments entrent en ligne de compte comme leur forme, leur état d'agrégation, leur charge de surface, la configuration électronique des atomes, la solubilité … De plus la grande diversité des matériaux capables d'être utilisés dans les nanotechnologies complique d'autant plus la tâche d'évaluation et de classification des nanomatériaux. Rien que pour les NTC, à l'heure actuelle on en dénombre au minimum plus de 50 000 types différant selon la matière première utilisée, le procédé de fabrication ou les catalyseurs utilisés.

La caractérisation exhaustive des nanomatériaux est souhaitable, mais nécessite de gros investissements quant au temps investit ainsi qu'aux moyens mis en œuvre. Parmi tous les paramètres mesurables, un consensus semble se dégager pour privilégier 8 paramètres dits « fondamentaux » et considérés comme les plus pertinents pour l'évaluation biologique :

- Taille et répartition de taille
- Forme
- Agrégation/agglomération
- Surface spécifique
- Composition (chimique, structurale …)
- Charge de surface
- Chimie de surface

Ces 8 paramètres permettent une approche minimale pour la caractérisation des nanomatériaux, mais rendent aussi possible une standardisation de ceux-ci. Sans description approfondie, les expérimentations menées seront difficilement comparables entre elles ni extrapolables aux autres nanomatériaux.

2.1. Paramètres physiques

2.1.1. Taille, distribution et morphologie

Selon la norme ISO 80004-2 (15), la taille est le premier critère de définition d'un nanomatériau et une nanoparticule (9, 10). C'est pourquoi il est essentiel de la caractériser correctement. La taille a une influence sur la réactivité des nanoparticules, leur stabilité …

Pour mesurer ces différentes dimensions plusieurs techniques sont classiquement utilisées. La plupart sont des techniques d'imagerie, permettant de visualiser la taille, la forme ou la surface des nanomatériaux. Mais il existe d'autres possibilités notamment pour la mesure de la disparité de taille au sein d'une population donnée de nanoparticules colloïdales, avec des techniques spectrophotométriques ou faisant appel à la diffusion de la lumière par exemple.

Pour déterminer les dimensions et la morphologie des différents nanomatériaux, plusieurs méthodes existent. Parmi les méthodes microscopiques disponibles, les plus puissantes et les plus utilisées dans la caractérisation du monde nanométrique sont d'un côté les microscopes électroniques à transmission (MET) ou à balayage (MEB) et de l'autre le microscope à force atomique (*atomic force microscope*, ou AFM). En marge de ces techniques de microscopie, on trouve des méthodes capable de caractériser des nanoparticules en analysant leur déplacement dans un fluide selon le mouvement Brownien, c'est le cas de la diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* ou DLS). Chacun des quatre appareillages repose sur des principes physiques différents.

Microscopie électronique

Le MET a été la méthode de référence pour la caractérisation des nano-objets pendant de nombreuses années. Le principe est de transmettre un faisceau d'électrons au travers d'un échantillon très mince. Lorsque les électrons rencontrent les parties denses de l'échantillon, ces derniers sont absorbés et ne seront donc pas détectés. On obtient donc une image « en négatif » de l'échantillon. En fonction des paramètres appliqués aux différentes lentilles et voltages, la résolution d'un MET peut atteindre 0,08 nanomètre. Cependant, l'image obtenue par cette technique est uniquement plane et ne représente qu'une projection du nano-objet. Ceci peut induire un biais quant à la mesure de taille ou la morphologie. De plus, les matériaux nanostructurés provenant d'une structure plus importante (prothèse fémorale en

titane nanostructurée) la préparation de l'échantillon reste problématique. En effet, il faut réussir à obtenir une couche d'échantillon assez fine pour que les électrons puissent traverser l'échantillon.

Dans le cas des MEBs, les progrès réalisés dans la maitrise des faisceaux d'électrons permettent d'atteindre des résolutions latérales jusqu'à des tailles légèrement inférieures au nanomètre. Le MEB est classiquement utilisé pour la mesure et la visualisation de surfaces nanostructurées et permet d'avoir une vue en relief de l'échantillon. Cependant sa résolution est limitée en hauteur et l'énergie transmise par les électrons peut entrainer une dégradation de l'échantillon (dans le cas d'échantillons de polymères structurés).

Microscopie à force atomique

L'AFM fait figure de référence au niveau des Instituts Nationaux de Métrologie. Son principe repose sur l'étude de la topographie d'un échantillon grâce au balayage de sa surface par une pointe reliée à un laser. L'AFM permet de réaliser des cartographies à l'échelle du nanomètre puis d'en reconstruire l'image tridimensionnelle. Son principal avantage tient dans sa facilité d'utilisation dans divers milieux (aussi bien à l'air ambiant que sous vide ou en milieu liquide). Sa résolution est régie par la taille et la forme des pointes utilisées (Figure 3). En plus, outre les caractéristiques physiques telles que l'épaisseur, la rugosité ou la taille d'un nanomatériau, l'AFM est aussi capable de déterminer l'élasticité, la résistance ou encore la force d'interaction entre un matériau et une molécule ou une protéine donnée (16).

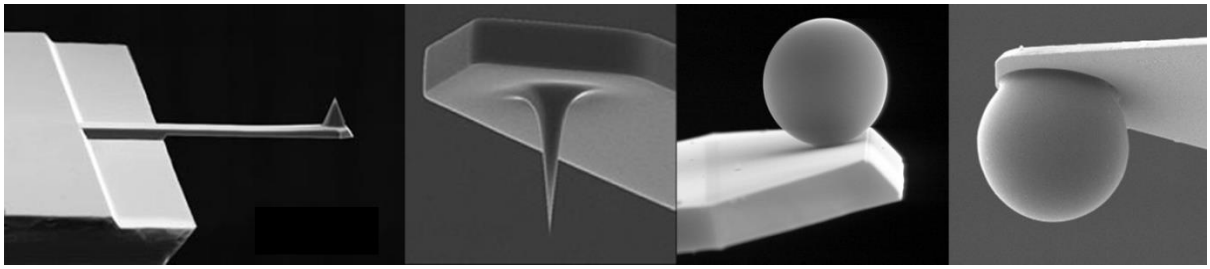


Figure 3 : Exemple de diverses pointes utilisables en AFM observées en MEB.

La combinaison entre ces différentes méthodes et plus particulièrement entre MEB et AFM permet les mesures des nanomatériaux dans les trois directions de l'espace grâce à la complémentarité de ces deux techniques. Mais encore une fois, quel que soit le type d'instrument utilisé, il faut s'assurer que les mesures réalisées restent plausibles et significatives. Cela montre l'importance de la complémentarité des méthodes pour toutes mesures physico-chimiques.

Diffusion dynamique de la lumière

La DLS est une technique d'analyse non destructive permettant de mesurer la taille de particules en suspension dans un liquide d'une taille pouvant aller de 1 à 500 nm. Les particules présentes dans le milieu sont soumises au mouvement Brownien et sont éclairées par un laser. Lorsque celui-ci atteint une particule, la lumière diffusée est émise dans toutes les directions. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée et un coefficient de diffusion est calculé en fonction du temps ce qui permet de déduire le diamètre de l'objet *via* l'équation de Stockes-Einstein. Cependant les différentes techniques de mesure de taille ne mesurent pas la même grandeur et ne sont pas directement comparables entre elles. La DLS permet de mesurer le diamètre hydrodynamique (Dh) d'une particule alors que le MET ne détecte que son diamètre de cœur (Dc) (Figure 4). Par exemple, il est difficile de détecter un revêtement organique (greffons organiques adsorbés, couches de solvatation…) sur une nanoparticule grâce à la microscopie électronique alors que les mesures en DLS en tiennent compte.

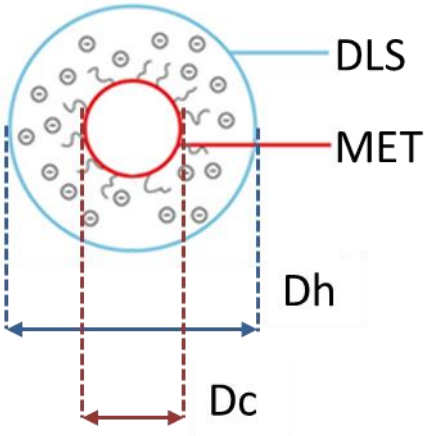


Figure 4 : Visualisation du diamètre hydrodynamique d'une nanoparticule. Dc : diamètre de cœur. Dh : diamètre hydrodynamique. DLS : Diffusion dynamique de la lumière. MET : microscopie électronique à transmission.

2.2. Paramètres chimiques

2.2.1. Composition et contaminations

La composition d'un matériau peut être déterminée par plusieurs techniques qui enregistrent des paramètres différents. On trouve notamment la composition chimique, la structure cristallographique, l'état (cristallin ou amorphe), la conformation moléculaire …

Ainsi la composition chimique doit comporter à la fois l'analyse des substances attendues, mais aussi celles indésirables comme les impuretés. Dans le cadre des médicaments la présence des impuretés et des substances apparentées est très codifiée. Ainsi la teneur déclarée en principe actif d'un médicament doit être comprise entre 95,0 et 105,0 %. (Pharmacopée Européenne) Mais dans le cas des DM et *a fortiori* des nanomatériaux, la frontière est encore floue. Il est donc nécessaire d'arriver à un consensus au niveau international pour l'étude des impuretés des nanomatériaux. Ces impuretés peuvent provenir de toutes les étapes de fabrication (intermédiaires de synthèse) mais aussi de la stérilisation ou du stockage du produit (produits de dégradation). Pour les nanomatériaux polymériques par exemple, les monomères résiduels n'ayant pas réagi peuvent être considérés comme des impuretés. De même les contaminants peuvent être d'origine chimique, provenant directement des procédés de fabrications des nano-objets (métaux utilisés comme catalyseurs).

2.2.2. Chimie et charge de surface

On désigne par « chimie de surface » les propriétés qui régissent l'interaction directe entre un nanomatériau et son environnement, en particulier biologique. Elle comprend notamment la charge de surface, les propriétés catalytiques ou l'adsorption/désorption de molécules. Elle dépend bien évidemment des molécules présentes à la surface du nanomatériau mais aussi, dans le cas d'un revêtement, de son épaisseur, son homogénéité, la solidité de l'ancrage … Pour les composés polymériques, les composés de faible masse moléculaire peuvent diffuser vers la surface, modifiant de ce fait les propriétés de cette dernière au cours du temps.

Revêtement

Aussi appelé « *coating* » en anglais, le choix du revêtement est souvent fonction de l'application prévue. La modification de la surface peut modifier la solubilité, la stabilité mais peut aussi entrainer des effets sur l'interaction du nanomatériau avec les molécules biologiques (17) et donc affecter son comportement et son activité biologique (18). Les modifications surfaciques apportées à un nanomatériau visent à augmenter sa biocompatibilité. La fonctionnalisation par le polyéthylèneglycol (PEG) en est un bon exemple. Ce dernier est utilisé pour éviter la reconnaissance par les macrophages et la phagocytose, dans le but d'augmenter la demi-vie de l'objet dans l'organisme et apporter une relative furtivité aux nano-objets (19).

Des études ont montré que la fonctionnalisation de *quantum dots* composés de Cadmium et Sélénium avec une « enveloppe » de sulfure de zinc, ZnS, permet de diminuer leur effet cytotoxique (20). Les revêtements appliqués doivent rester stables sur le long terme pour éviter l'apparition d'effets secondaires indésirables et une éventuelle toxicité.

Il existe une multitude de possibilité de modifications surfaciques entrainant des impacts majeurs sur les interactions avec les systèmes biologiques. Le comportement réel d'un nanomatériau est dicté principalement par l'ensemble « cœur/couronne ». C'est pourquoi l'évaluation des risques biologiques se fera préférentiellement sur la combinaison du nanomatériau avec son enrobage.

Charge de surface

L'état de la charge de surface d'un nano-objet renseigne sur ses capacités d'adsorption des ions et autres composants biologiques présent dans son environnement (21). La méthode de référence à l'heure actuelle pour mesurer la charge de surface est la détermination du potentiel Zeta (ζ). Il représente la charge électrique qu'une particule ou une surface possèdent grâce aux ions qui l'entourent quand elles sont en solution. Sa valeur ne représente pas uniquement la charge intrinsèque de l'objet, mais prend aussi en compte tous les ions entourant ce dernier, formant ce que l'on appelle la « couche de solvatation ».

3. Particularité de la dimension nanométrique

Classiquement, les propriétés d'un matériau dépendent de sa structure et de sa composition chimique. Cependant, lors du passage à l'échelle nanométrique, des modifications des caractéristiques chimiques ou physiques importantes peuvent être observées (modification des points de fusion, propriétés magnétiques, électriques, optiques, mécaniques …)

3.1. Effets de surface dominants

La conséquence directe de la diminution de la taille est l'augmentation du ratio surface sur volume. Plus un objet est petit, plus sa surface est importante par rapport à son volume (22). Par exemple, une sphère composée uniquement d'argent et pesant 10 g possède une surface externe d'environ 5 cm^2, alors que pour la même masse, des nanoparticules de 10 nm de diamètre totalisent une surface externe d'environ 600 m^2 ! Un microcristal de fer (1 µm de diamètre) présente moins de 1 % de ses atomes à la surface, alors qu'un nanocristal (1 nm) possède près de 90 % de ses atomes en surface (23) ! Par conséquent, la surface spécifique (surface externe par unité de masse), qui est la surface totale d'échange, est bien plus importante pour les nano-objets.

Les nanomatériaux inorganiques sont souvent caractérisés par un cœur cristallin ordonné et une surface localement désordonnée. Dans les nanomatériaux, la proportion d'atomes en surface est plus importante que dans le cœur impliquant un transfert d'électrons facilité en surface et par conséquence une plus grande réactivité. Le réseau cristallin subit des contraintes qui conduisent à des déformations et des réarrangements. Cette configuration modifie donc les phénomènes de surface, notamment l'adsorption et la fixation d'espèces chimiques… Cette réactivité particulière est d'ailleurs largement exploitée dans les applications chimiques, avec l'utilisation par exemple de nanoparticules métalliques jouant le rôle de catalyseurs (24), et biologiques.

3.2. Agglomération et agrégation

L'instabilité thermodynamique de surface des nanoparticules liée aux mouvements électroniques rend ces dernières très réactives. L'énergie de surface et leur dispersion contribuent aux phénomènes d'agrégation des nanoparticules classiquement observée pour

ces matériaux (25, 26). De tels comportements sont bien connus et très étudiés dans le domaine des colloïdes (27).

L'agglomérat est une association de particules liées par des forces faibles (Van der Waals, électrostatiques, tension superficielle), les particules étant adjacentes entre elles. La morphologie des agglomérats n'est pas une propriété du nanomatériau mais un état temporaire d'équilibre dynamique entre les effets de dispersion et d'agglomération dans une suspension.

L'agrégat est une nanoparticule hétérogène dans laquelle les différents constituants sont reliés par des liaisons fortes (types covalentes). Il peut provenir d'une fusion entre plusieurs nanoparticules. La vitesse d'agrégation conditionne la forme finale de l'agrégat (dimensions, dureté…) et surtout son interaction avec le milieu dans lequel il se trouve (inclusion dans les cellules). L'ensemble de ces informations peut se révéler déterminant dans l'évaluation biologique des dispositifs contenant des nanomatériaux (28).

3.3. Taille et propriétés mécaniques

Dans certains cas, la diminution de la taille peut conduire à des produits moins denses mais qui conservent tout de même leurs propriétés mécaniques et physiques, par rapport aux matériaux massifs, voire même les améliorent (29). Si certaines nanoparticules incorporées dans un matériau pour le renforcer ne sont que des accessoires, d'autres montrent des propriétés mécaniques et chimiques intéressantes. Par exemple, les nanotubes de carbone qui ont des propriétés n'existant pas dans la nature : ils sont à la fois plus résistants et plus légers que l'acier et plus durs que le diamant. Ces nanomatériaux sont formés d'atomes de carbone disposés en structure régulière.

3.4. Nanomatériaux et échelle biologique

Pour améliorer l'interaction entre nanomatériaux et milieux biologiques en vue d'applications médicales, on mime de plus en plus les systèmes biologiques grâce à la nanostructuration de surface. La dimension nanométrique des particules minérales naturelles garantirait une robustesse idéale du matériau en s'accommodant au mieux des défauts naturels (30). En effet, la nature semble tirer profit des structures nanométriques pour produire des systèmes biologiques performants. L'os naturel par exemple est décrit

schématiquement comme d'origine biologique avec des renforts fibrillaires dans lesquels sont inclus des cristaux de 10 à 50 nm d'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) dans une matrice de protéines. La version synthétique de cette hydroxyapatite est reconnue comme possédant d'excellentes qualités d'ostéoconduction à l'échelle macroscopique. Cependant, elle ne peut être complètement résorbée et reste donc à long terme dans l'organisme en tant qu'implant. Le fait d'abaisser la taille des cristaux d'hydroxyapatite à l'échelle nanométrique a pour conséquence de les rendre biorésorbables (31).

De plus, comme précisé précédemment, plus il y a d'atomes exposés en surface, plus la surface d'échange avec le milieu est importante. Cette particularité se révèle intéressante dans le cas des applications biologiques. En effet, un matériau mis en présence d'un milieu biologique verra se produire une adsorption de protéines à sa surface. Ces dernières vont adopter différentes conformations selon les propriétés physico-chimiques de la surface (rugosité, topographie, charge, réactivité…). Le type de protéines adsorbées ainsi que leurs conformations prises vont déterminer leurs interactions avec les récepteurs membranaires des cellules, permettant ou non l'adhésion, la prolifération,… de ces cellules à la surface du matériau (32, 33). Certains auteurs émettent l'hypothèse que l'augmentation de colonisation des surfaces nanostructurées par des cellules pourrait être due à la ressemblance entre l'échelle nanométrique du matériau et la taille des protéines (34, 35). Il a été démontré que la fibronectine, adsorbée sur des matériaux nanostructurés favorisait la prolifération des ostéoblastes (34). Ainsi, les céramiques, les métaux et certains polymères nanostructurés présentent une meilleure biocompatibilité que leurs alternatives « classiques ». Webster et al (35) ont même émis le postulat que la topographie à l'échelle du nanomètre d'une surface serait suffisante pour favoriser l'adhésion de cellules, indépendamment de la chimie de surface.

On remarque donc que les nanomatériaux possèdent des propriétés uniques qui peuvent s'avérer très utiles dans le domaine de la santé. Les matériaux synthétiques mimant de mieux en mieux les systèmes biologiques, permettraient donc d'améliorer grandement leur biocompatibilité. De plus, grâce à leur taille, les nanoparticules sont capables de circuler et de pénétrer dans de nombreux types cellulaires. Néanmoins, ces nanoparticules restent des corps étrangers susceptibles d'être éliminés de l'organisme avant d'avoir atteint leurs cibles. Pourtant, les nanotechnologies donnent l'espoir d'une médecine personnalisée : nanosondes multifonctionnelles et intelligentes capables de détecter le développement de maladies, de

détruire des cellules cancéreuses, de dispenser la dose exacte de principe actif (PA) au moment opportun voire même de transmettre en temps réel les données médicales au médecin pour une surveillance de l'évolution de la maladie.

L'essor de ces nanotechnologies permettrait l'exploration de multiples possibilités d'applications mais pose aussi des questions quant à leurs impacts biologiques potentiels. C'est précisément leurs propriétés (petite taille, surface spécifique importante, réactivité accrue …) qui entrainent la crainte de nombreux spécialistes en termes de toxicité.

Le risque est défini comme « la combinaison entre le danger intrinsèque d'un produit et de la probabilité d'exposition humaine à ce produit ». Il est généralement admis que la toxicité d'un nanomatériau est différente de sa version micro- ou macrométrique sans être forcément plus importante.

4. Nanomatériaux et systèmes biologiques

Lorsqu'un nanomatériau est exposé *in vitro* à un milieu biologique, il est recouvert de façon quasi immédiate d'une couche en équilibre dynamique de protéines appelée « couronne ». Cependant cela est mal corrélé aux situations *in vivo*. En effet, les modèles *in vitro* classiquement utilisés font appel à du plasma ou du sérum. Or, dans ces conditions, la chélation des ions calcium et la suppression des divers facteurs de coagulation (absence du fibrinogène dans le sérum) ou encore l'absence d'activation du système du complément ne permettent pas d'observer l'action de ces deux derniers systèmes *in vitro*.

4.1. Interaction avec les protéines et ses conséquences

4.1.1. Cinétique de liaison aux nanoparticules colloïdales

La composition de la couronne protéique adsorbée à la surface des nano-objets dépend des concentrations et des protéines présentes dans les fluides biologiques. L'affinité d'une protéine pour un matériau est différente si celui-ci est sous forme nanométrique ou massif (en raison de la taille, de la surface spécifique, de la réactivité particulière des nanoparticules …). De plus, le complexe nano-objet/protéine est susceptible d'évoluer au cours du temps. Ce phénomène, appelé « effet Vroman » (Figure 5), explique que les protéines à forte

concentration s'adsorbent en premier avant d'être remplacées par des protéines caractérisées par à la fois une plus forte affinité mais aussi une plus faible concentration (36). Ainsi, l'albumine (40 $g.L^{-1}$) s'adsorbe très rapidement à la surface de diverses nanoparticules avant d'être remplacée par d'autres protéines telles que le fibrinogène, les protéines du complément, les immunoglobulines etc. …

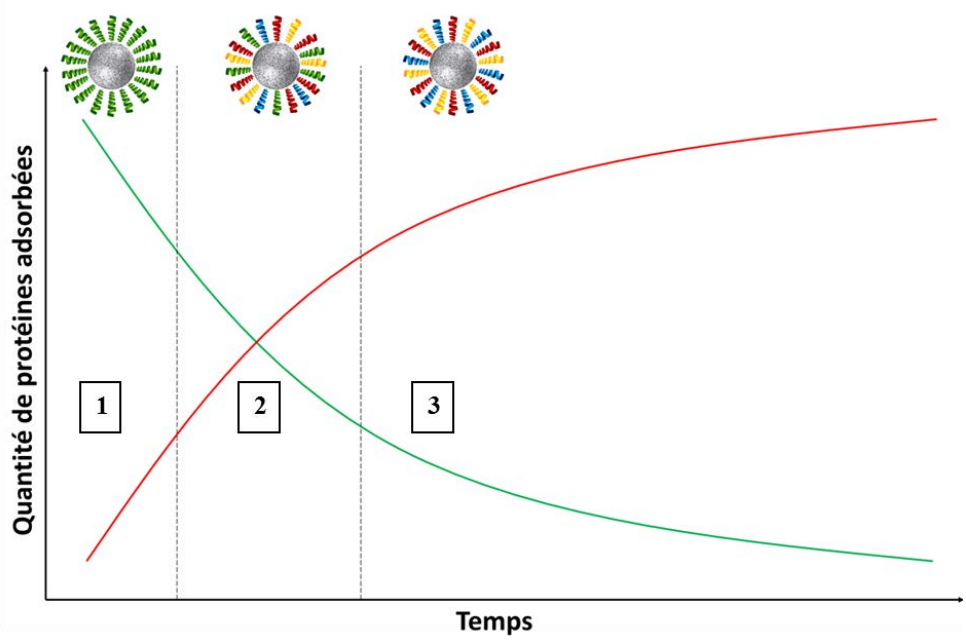


Figure 5 : Effet Vroman : la nature des protéines adsorbées à la surface d'une nanoparticule est modifiée au cours du temps. (1) liaison non spécifique des protéines de faible affinité en grande quantité. (2) état d'équilibre entre protéines de faible et forte affinité. (3) liaison des protéines de forte affinité. (36)

4.1.2. Adsorption protéique et propriétés du matériau

Il a été montré que l'adsorption des protéines tend à augmenter avec une valeur positive élevée du potentiel zêta du nano-objet, ce paramètre reflétant sa charge de surface. Ceci est en partie expliqué par la valeur du point isoélectrique des protéines plasmatiques inférieur à la valeur du pH sanguin impliquant une charge globale des protéines négative. Le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface influence non seulement la quantité de protéines adsorbées, mais aussi leur type. De façon globale, plus la surface d'un nano-objet est hydrophobe, plus cet objet va adsorber de protéines plasmatiques à sa surface et sera par conséquent opsonisé (processus biologique favorisant la phagocytose par les macrophages) plus rapidement (37).

Certaines études montrent que les propriétés de surface des nanomatériaux seraient plus déterminantes en termes d'adsorption protéiques, que la composition même du nanomatériau. Cependant, cette composition reste importante, car de nombreux composés peuvent diffuser du cœur de l'objet vers sa surface modifiant de ce fait leurs propriétés physico-chimiques de surface. Dans le cas de nanoparticules de type « cœur-couronne », un remaniement s'opère et les constituants du cœur finissent par se retrouver en surface et modifient ainsi la réactivité de la surface. Il faut aussi prendre en compte le fait que la conformation ainsi que la stabilité des protéines peuvent être modifiées après adsorption.

La présence de surfaces nanostructurées détermine aussi la cinétique d'adsorption des protéines sur ces matériaux. L'organisation des nanostructures est elle aussi déterminante pour l'adsorption des protéines et les réactions cellulaires. L'adsorption peut être limitée par greffage de « nanobrosse » de polymères de type *N,N*-diméthylacrylamide (PDMA) en surface d'un matériau. En effet, plus le greffage est important, et plus les brosses sont longues, moins les protéines s'adsorbent (38). Le même effet a été démontré avec des brosses de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) ou encore avec des nanoparticules d'acide poly(lactique-*co*-glycolique) greffées par du PEO (39).

Les propriétés de surface des nanomatériaux sont donc déterminantes dans la modulation de l'adsorption protéique.

4.1.3. Adsorption protéique et réponse cellulaire

Il a été montré que l'adsorption protéique à la surface de nanomatériaux était dépendante des propriétés physico-chimiques de ces derniers (36). Cette adsorption peut entraîner des modifications de taille et de charge de surface et donc potentiellement avoir des conséquences sur l'internalisation des nano-objets, la réponse cellulaire ou leur distribution au sein de l'organisme.

Le phénomène d'adsorption protéique joue un rôle important pour l'activation du système du complément. En effet, les nanomatériaux sont des corps étrangers qui peuvent éventuellement l'activer et donc être captés par les macrophages situés dans des organes tels que le foie ou la rate.

Ainsi plus le nano-objet adsorbera des protéines du complément, des immunoglobulines G ou encore du fibrinogène, plus il attirera les monocyte/macrophages et sera phagocyté plus rapidement et potentiellement éliminé pour les nanoparticules colloïdales. Ces dernières vont ensuite être stockées et concentrées dans le foie et la rate.

Inversement, l'adsorption covalente non spécifique d'albumine semble augmenter la demi-vie des objets au sein de la circulation sanguine et diminuer la réponse inflammatoire (40).

En ce qui concerne la nanostructuration de surface, la densité de greffage des brosses influence la nature des protéines adsorbées et a des conséquences variables en termes de d'activation de la coagulation ou d'activation plaquettaire. Des fortes densités de PDMA greffés n'entrainent pas l'activation plaquettaire alors qu'une plus faible densité peut aboutir à une coagulation. Des matériaux nanostructurés avec des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) (PACA) peuvent induire une réponse différente au système immunitaire en fonction de la géométrie (brosses ou boucles) du greffage apposé aux nanoparticules (dextrane, chitosan …) (41).

Pour les matériaux nanostructurés, la quantité et le type de protéines adsorbées sont essentiels pour moduler l'adhésion, la migration ou la différenciation cellulaire. Yang *et al* (42) ont montrés qu'une surface en titane nanostructurée adsorbait de façon plus spécifique la fibronectine par rapport à l'albumine. L'adhésion des ostéoblastes en est donc facilitée et l'ostéointégration se fait plus facilement, ce qui aide à la cicatrisation.

En résumé, l'adsorption protéique est un phénomène inévitable. Aucun DM implanté ne peut s'y soustraire à plus ou moins long terme. Cependant il est possible de la limiter, et donc d'augmenter le temps de demi-vie d'un nano-objet directement au sein de la circulation sanguine ou encore de la moduler et de l'orienter pour obtenir un effet contrôlé et voulu après implantation du DM.

4.2. Aspects pharmacocinétiques

Les phénomènes d'absorption et de biodistribution ne concernent que les nano-objets libres dans la circulation ou les tissus. Ces derniers proviennent essentiellement des nanoparticules colloïdales qui ont été injectées directement au patient, ou de l'usure des DM contenant des nanomatériaux et qui sont relargués progressivement. Dans le cadre de l'utilisation de DM, les nanomatériaux peuvent pénétrer par voie respiratoire, digestive ou par la peau pour les DM transcutanés, avant de se retrouver dans la circulation sanguine. Bien évidemment les DM implantables se retrouvent directement au contact des tissus et du sang. Une fois dans la circulation, ces nano-objets peuvent se retrouver stockés dans le foie ou la rate avant d'être éliminés dans les urines ou les fèces selons leurs caractéristiques physico-chimiques (taille, charge de surface …) (Figure 6).

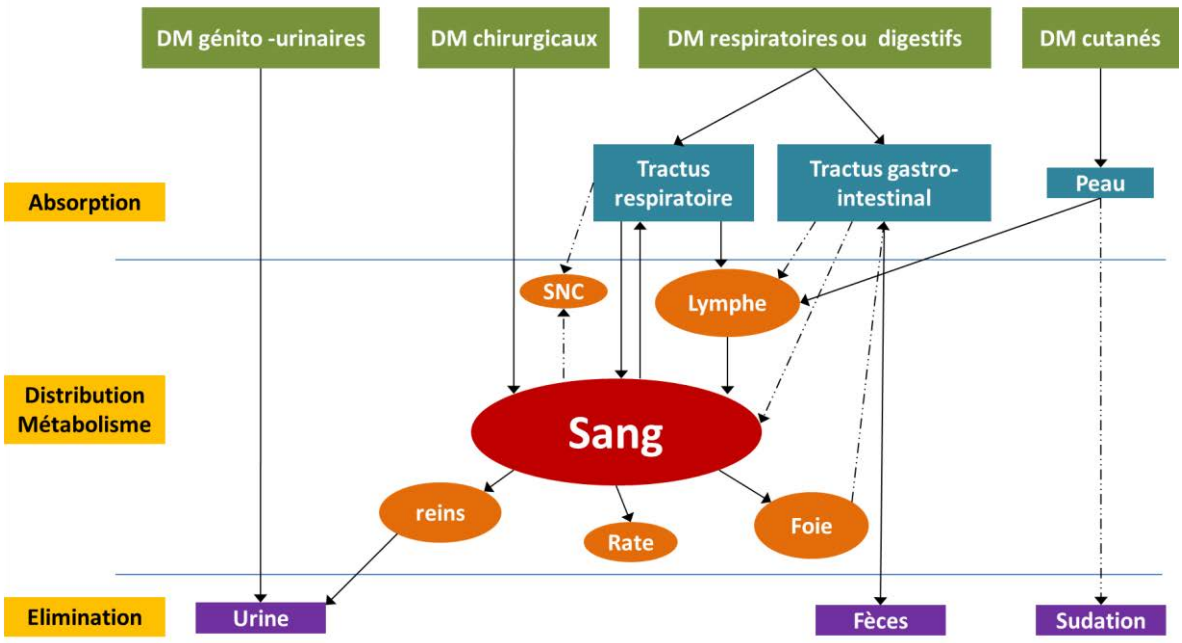


Figure 6 : Distribution des nanomatériaux incorporés dans des DM selon (43). Voies confirmées (flèches pleines) ou hypothétiques (pointillées). SNC : système nerveux central.

4.2.1. Absorption

Les DM topiques tels que les pansements chargés de nanoparticules d'argent entrainent une exposition importante de la peau à ces nano-objets. La peau saine est généralement une barrière physique efficace contre les agressions environnementales. Sa structuration en trois couches (épiderme, derme et hypoderme) permet d'arrêter la majorité des produits chimiques (principalement dans la couche externe de l'épiderme). C'est

aussi le cas pour les nanoparticules d'argent qui ont montré une faible absorption dans une peau humaine saine (44). Cependant il convient de noter que dans le cas où cette barrière naturelle venait à être endommagée, comme c'est souvent le cas lors d'utilisation de pansements, la pénétration systémique des nanoparticules d'argent est possible voire importante (44).

Concernant la voie orale et la présence de nano-objet dans le tractus gastro-intestinal, ces derniers proviennent principalement des DM digestifs, mais aussi de la migration des nanoparticules inhalées ou bien des produits dentaires nanostructurés. La taille et la charge des nanoparticules ont une grande influence sur leur capacité à être absorbées par l'intestin. Dans le cas des nanoparticules d'or colloïdales, plus ces dernières sont petites, plus grande sera leur absorption intestinales et elles seront aussi distribuées dans un plus grand nombre d'organes (45).

Les nanoparticules ingérées sont rapidement éliminées (à 98 % dans les selles au bout de 48 h et le reste dans l'urine). Cependant, certaines études suggèrent une dissémination dans la circulation sanguine avec un stockage dans les organes cibles comme le foie ou les reins. C'est le cas pour les débris nanoparticulaires des prothèses dentaires qui, une fois absorbés par l'intestin, conduisent à des effets secondaires comme de la fièvre, une inflammation du foie et/ou de la rate, une insuffisance rénale aigue … Tous ces symptômes ont été observés au bout d'un an chez des patients qui avaient reçu une pose de bridges dentaires en céramique. Après retrait de ces implants, on observe une régressions des symptômes jusqu'à complète disparition de ces derniers (46).

*4.2.2. **Distribution systémique et métabolisme***

Une fois dans la circulation sanguine ou dans les tissus, les nanoparticules colloïdales ou provenant de l'usure des DM peuvent être opsonisées par les molécules du complément afin de faciliter leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial puis phagocytés par les monocytes/macrophages. Ils sont ensuite dirigés dans des organes tels que la rate, le foie ou les reins (47). Ils sont potentiellement détectables à long terme dans le cœur, les poumons, la moelle osseuse et une migration dans le système nerveux central est aussi envisageable.

La fonctionnalisation de surface des nanomatériaux joue un rôle particulier car elle peut influencer la bio-distribution ainsi que sa cinétique. Des nanoparticules colloïdales « furtives » recouvertes de polyéthylène glycol (PEG) ont une demi-vie augmentée dans la

circulation sanguine (48), la présence de PEG empêche en partie leur capture par le foie ou la rate (49) par la création d'un encombrement stérique autour de la nanoparticule, limitant l'accès au cœur de l'objet.

*4.2.3. **Elimination***

L'élimination des nano-objets, que ce soit sous forme colloïdale ou à partir des débris des DM est encore mal connue et dépend principalement de la voie d'exposition et des paramètres physico-chimiques de l'objet considéré (taille, charge de surface …). Ceux ingérés sont principalement éliminés *via* les selles comme la majorité des substances étrangères empruntant cette voie ; et ceux inhalés sont soit absorbés au sein de la circulation sanguine ou bien éliminés par le système muco-ciliaire des bronches.

Pour ceux présents dans la circulation sanguine, la voie classique d'élimination rénale est souvent envisagée, comme dans le cas des nanotubes de carbone (50). L'autre voie suggérée pour l'élimination des nanoparticules est hépatique avec une excrétion biliaire (51). Cette voie d'élimination est connue en pharmacologie mais reste à confirmer pour les nanoparticules.

La possible persistance à long terme des nanomatériaux dans le corps humain pourrait entraîner des toxicités chroniques pour certains d'entre eux, voire même le développement potentiel de tumeurs cancéreuses. Mais les connaissances sur les conséquences de l'accumulation des nano-objets au sein de l'organisme sont encore lacunaires et beaucoup d'études scientifiques se contredisent quant à leur toxicité réelle.

5. Connaissances sur la toxicité des nanomatériaux

Plusieurs types de matériaux sont utilisés pour la fabrication de DM nanostructurés ou intégrant des nano-objets (nanoparticules d'or, silice nanométrique, nanoparticules magnétiques, hydroxyapatite, titane nanostructuré, nanodiamant etc…). Ce travail se focalise principalement sur les nanoparticules pouvant être produites lors de l'usure et la dégradation des DM, les nanoparticules d'argents (présentes dans des DM commercialisés tels que les pansements) et les nanotubes de carbones (utilisés dans des DM en cours de développement).

5.1. Débris et usure des DM

Des nano-objets peuvent être retrouvés chez des patients porteurs d'un DM, qu'ils proviennent d'impuretés ou de résidus de fabrication. Des nanoparticules ont ainsi pu être détectées dans les tissus adjacents aux implants soumis à des frottements répétés.

Les prothèses articulaires subissent de nombreuses contraintes pouvant les dégrader : frictions entre surface articulaires, interface avec l'os, corrosion … Les débris métalliques génèrent des particules d'une taille moyenne de 50 nm à un taux d'environ 10^{12} particules par an (52). Cependant il est possible que la quantité de particules avec un diamètre inférieur à 50 nm soit sous-estimée à cause de la limitation imposée par les techniques de détection notamment en milieu biologique.

Les débris provenant de l'usure des DM sont classiquement phagocytés par les macrophages avant d'être transportés vers les ganglions lymphatiques pour être excrétés (53). Lorsque cette voie d'élimination se retrouve en surcharge, les macrophages sont retenus localement et entrainent une inflammation tissulaire. La phagocytose est un processus dynamique dépendant de la taille de la particule considérée. En ce qui concerne les nanoparticules, elles subissent majoritairement une endocytose non spécifique appelée pinocytose.

La réponse inflammatoire est fréquemment observée, mais l'accumulation de nanoparticules peut aussi entraîner des perturbations du système immunitaire (54), des lésions ostéolytiques voire le descellement de la prothèse. Leur implication dans la dysfonction immunitaire fait craindre des réactions d'hypersensibilité.

5.2. Nanotubes de carbone

Les NTC ont un fort potentiel en médecine en tant que nanomatériau. Pour le moment leur utilisation dans le cadre des DM reste au stade de la recherche.

Un NTC est formé d'un ou plusieurs feuillets de graphène (dit « single wall » ou « multi wall ») enroulés sur eux-mêmes et formant une structure cylindrique. Leur rapport longueur sur diamètre étant relativement important, ils offrent des perspectives intéressantes dans le domaine médical. Grâce à leur dimension proche de celle des brins d'ADN, ils peuvent interagir plus efficacement avec les matériaux biologiques. De plus leur surface peut facilement être fonctionnalisée afin de moduler leur comportement biologique, améliorer leur

biocompatibilité ou même leur conférer de nouvelles capacités en leur greffant des molécules actives (comme des traitements antibactériens) (55). Leurs propriétés physico-chimiques particulières en font des candidats de choix pour la reconnaissance et le dosage moléculaire ultrasensible.

Leur forte ressemblance physique avec les fibres d'amiante sont cependant l'objet de fortes préoccupations au niveau toxicologique (56). Même s'il est encore difficile d'arriver à un consensus clair à l'heure actuelle, du fait de la grande variabilité des NTC utilisés et des conditions opératoires des travaux de recherche (56, 57).

Il semblerait que les caractéristiques des NTC, telles que leur taille, leur forme ou leur taux d'agrégation, soient des facteurs modulant grandement la toxicité de ces nano-objets (58). La contradiction entre les différentes études provient aussi de disparité des conditions expérimentales : les doses administrées sont souvent trop importantes et ne collent à aucun modèle qui se voudrait cliniquement réaliste (59). Les études ne prennent pas toujours en compte le taux d'agrégation des NTC ni leur mode de fabrication (60) qui entrainent de grandes disparités en terme de toxicité observée.

Ainsi actuellement, on ne peut tirer de conclusion définitive sur la toxicité potentielle des NTC. Même si le foie reste un site d'accumulation principal, l'essentiel des NTC administrés avec injection intraveineuse seraient éliminés par la voie rénale (61, 62). Il faut donc rester prudent lors de l'interprétation des résultats des études toxicologiques et identifier précisément les facteurs responsables de la toxicité observée. Il n'en reste pas moins que les NTC présentent de réels intérêts pour des applications biologiques.

5.3. Nanoparticules d'argent

Les propriétés antimicrobiennes de l'argent sont connues depuis l'Antiquité. Son mécanisme d'action reste mal connu, il serait dû aux ions créés lors de sa dissolution (63), en parallèle certains travaux ont également montré l'existence d'un phénomène naturel de corrosion qui entrainerait aussi la formation d'ions Ag^{+}. Les nanoparticules d'argent (AgNP) ont elles aussi une activité anti-infectieuse et antivirale, dépendante de leur taille et de leur forme (64). A titre d'exemple, les AgNP de taille inférieure à 10 nm seraient les plus réactives (65).

Si la toxicité des AgNP par voie orale ou pulmonaire est relativement bien étudiée, les risques d'exposition par voie cutanée sont moins bien connus et ce malgré les DM intégrants de tels nanoparticules (pansements, textiles médicaux…). Encore une fois, l'absorption des AgNP par voie cutanée reste faible sans lésion. Mais sur une peau lésée leur pénétration systémique peut être importante (44). Le cas d'un patient présentant des brûlures sur une large surface corporelle et traité par Acticoat® a pu être documenté. Ce dernier a développé une hépatotoxicité après une semaine de traitement local, avec une régression des symptômes dès l'arrêt du traitement (66).

La deuxième voie principale d'exposition à l'argent nanométrique est son incorporation dans DM chirurgicaux. S'il a été démontré qu'un cathéter dont la surface interne est recouverte d'AgNP a effectivement une activité antibactérienne, celui-ci entraine aussi une accélération de la coagulation avec un risque possible de thrombose associé (67). De la même manière, l'essai clinique AVERT, qui portait sur des valves cardiaques nanostructurées avec de l'argent, a dû être arrêté prématurément. Plusieurs patients ont présenté des cas de thrombose ou de fuite au niveau de la valve pendant l'étude. Le revêtement nanométrique a été mis en cause, même si les données recueillies n'étaient pas statistiquement significatives (68, 69).

Finalement l'utilisation des nanotechnologies en médecine et en particulier dans le domaine médical soulève des craintes notamment en termes de sécurité sanitaire. Cependant le manque de modèles toxicologiques adaptés, et la difficulté d'évaluer précisément les conditions d'exposition (dose reçue, type de nanoparticules, taille, forme …), empêche actuellement la communauté scientifique d'arriver à un consensus clair. De plus, avec l'essor des nanotechnologies, les questions d'ordre sanitaire ne s'appliquent pas seulement au domaine médical mais à un pan bien plus large de la vie quotidienne. Enfin, pour citer Paracelse « Tout est poison et rien n'est sans poison ; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison. », et ceci est d'autant plus vrai en ce qui concerne le monde nanométrique.

IV DISPOSITIFS MEDICAUX ET NANOMATERIAUX

La nanomédecine est une des applications les plus prometteuses au sein des nanotechnologies. Elle exploite, pour le compte de la santé, les propriétés physiques, chimiques et biologiques novatrices des nanomatériaux.

Dans cette partie, des exemples d'applications médicales (Table 1) sont détaillés pour avoir une idée globale de l'utilisation des nanomatériaux. Le but est de montrer que les nanotechnologies sont plébiscitées dans plusieurs domaines d'applications, en allant du matériel traditionnel, comme les aiguilles (amélioration de la pénétration dans la peau) ou les pansements (meilleure cicatrisation et propriétés antibactériennes), aux implants orthopédiques (diminution des maladies nosocomiales) ou dentaires (meilleure résistance et action antibactérienne), en passant par des appareils électroniques biomimétiques sophistiqués (organes artificiels, diagnostics *in vivo*). Globalement, les nanotechnologies ont pour vocation d'apporter une nouvelle fonction au DM en plus de sa fonction primaire.

Table 1 : Liste des différents DM incorporant des nanotechnologies

Nom commercial du dispositif médical	NOM DU FABRICANT (Pays)	Type de dispositif	Nanotechnologie utilisée
Acticoat®	SMITH & NEPHEW (Royaume-Uni)	Pansement	Nanoparticules d'argent métallique (à partir de 15 nm) Silcryst™
Adper™ Scotchbond™ SE	3M ESPE (USA)	Système adhésif	Nano-charges de zircone silanisées
NanoMask®	EMERGENCY FILTRATION PRODUCTS (USA)	Masque chirurgical	Nanoparticules d'oxyde de magnésium
NanoFenseTM	APPLIED NANOSCIENCES	Masque chirurgical filtrant des virus grippaux	Nanoparticules d'argent
Mipan® Magic Silver Nano	HYOSUNG (Corée)	Textile à effet antimicrobien permanent	Nano-argent
Aerosil®	DEGUSSA (Allemagne)	Composite de restauration dentaire	Nanoparticule de dioxyde de silice (7-40nm)
Filtek™ Supreme	3M ESPE (USA)	Composite de restauration dentaire photopolymérisable	Nanoparticules de silice
Ketac™ N100	3M ESPE (USA)	Composite de restauration dentaire	Nano-ionomère
Grandio®	VOCO (Allemagne)	Composite de restauration dentaire	Nano-composite hybride
Optiglaze	GC CORPORATION (Japon)	Composite de restauration dentaire photopolymérisable	Nano-charges de silice
Kappalux Nano	PRODUITS DENTAIRES PIERRE ROLLAND (France)	Produit de restauration dentaire à base de résine synthétique	Nanoparticules de dioxyde de silicium et d'oxyde de zirconium (10-100 nm)
NanoImplant®	TIMPLANT (République Tchèque)	Implant dentaire métallique	Titane nanostructuré
Nanogel®	TEKNIMED (France)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire (100-200 nm)
NanostimTM / Ostim®	AAP BIOMATIERALS (Allemagne) / MEDTRONIC (France)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire
PerOssal®	AAP BIOMATERIALS (Allemagne)	Produit pour comblement osseux injectable	Hydroxyapatite nanoparticulaire
FortrOss®	PIONEER SURGICAL TECHNOLOGY (USA)	Produit pour comblement osseux	Nanoparticules d'hydroxyapatite de la technologie NanOss® avec la matrice ostéoconductive E-Matrix
Vitoss® Scaffold	ORTHOVITA (USA)	Produit pour comblement osseux	Phosphate de calcium de porosité nanométrique
Puretex®	SYBRON IMPLANT SOLUTIONS (USA)	Implant orthopédique métallique nanostructuré	Titane pur ayant une surface nanoporeuse
Nanos™ Symax™	SMITH&NEPHEW (Royaume-Uni) STRYKER (France)	Prothèse orthopédique Prothèse articulaire	Revêtement microporeux Bonit® + nanocristaux d'hydroxyapatite fabriqué par DOT (Allemagne)
NanoTite™	BIOMET *3i*	Prothèses orthopédique et dentaire	Dépôt en surface de nanocristaux de phosphate de calcium (20-100 nm)

Rheo Knee	OSSUR (Islande)	Prothèse externe de genou	Nanoparticules de fer (100 nm)
Debiostent™	DEBIOTECH (Suisse)	Revêtement de stent	Revêtement nanostructuré en céramique (TiO_2, ZrO_2, SiO_2, IrO_2, Al_2O_3, CaP) d'épaisseur de 100 nm à 10 µm
Catania™	CELONOVA BIOSCIENCES (Canada)	Stent coronaire nu	Revêtement de polymère Polyzene®-F (épaisseur de 40-50 nm)
VestaSync™	MIV THERAPEUTICS (Canada)	Stent actif	Revêtement ultra-fin en hydroxyapatite avec une porosité de 100 nm
AVflo™ NovaMesh™	NICAST (Israël)	Greffon d'accès vasculaire autoobturateur Treillis herniaire intra-abdominal	Nanotissu de polymère électrofilé
	Equipe du Royal Free Hospital de Londres (Royaume-Uni)	Greffon vasculaire	Nanocages d'UCL-NanoBio™, formant un nanocomposite de polymère breveté
ON-Q® SilverSoaker™	I-FLOW CORP. (USA)	Cathéter pour anesthésie	Revêtements incorporant des nanoparticules d'argent (technologie SilvaGard™) fabriqué par ACRYMED (USA)
Diamaze PSD	GFD GESELLSCHAFT FÜR DIAMANTPRODUKTE MBH (Allemagne)	Lame de scalpel	Revêtement nanostructuré en diamant (épaisseur de 20-40 nm)
Sandvik Bioline 1RK91™	AB SANDVIK MATERIALS TECHNOLOGY (Suède)	Aiguille de suture	Nanocristaux d'acier inoxydable (1-10nm)
Mako	ORTHOSENSOR (USA)	Appareil chirurgical livrant des données sur l'implantation orthopédique personnalisée du genou	Nanocapteurs
Argus™	SECOND SIGHT MEDICAL PRODUCTS (USA)	Implant rétinien	Composant nano-électronique
	Equipe américaine du MIT (*Massachuset Institute of Technology*)	Dispositif de surveillance de la glycémie in vivo, mis en place sous la peau	Nanotubes de carbone

1. Dispositifs non implantables

1.1. Aiguilles

Les fabricants ont innové dans le but d'améliorer les dispositifs médicaux d'administration des traitements. Grâce à la miniaturisation dérivée de l'électronique, la taille des aiguilles hypodermiques a ainsi considérablement diminué, s'approchant maintenant du micromètre. Ces micro-aiguilles sont conçues dans le but d'être les plus petites et les plus aiguisées possibles, pour permettre une pénétration peu profonde dans la peau tout en limitant les lésions tissulaires et la sensation de douleur.

Souvent constituées de métal (nickel, titane, or …), de silicone ou de polymères biodégradables, ces nouvelles générations de systèmes d'injection se présentent le plus souvent sous la forme d'une matrice de micro-aiguilles ne faisant que quelques centaines de micromètres de longueur et dont le diamètre de la pointe peut être submicronique. A cause de ces dimensions supérieures à l'échelle du micromètre, les aiguilles ne font pas partie, à proprement parlé, des nanotechnologies mais restent utiles pour délivrer des micro- ou nano-doses de médicaments à travers la peau voire même de la cornée. Parmi les dispositifs actuellement commercialisés, on peut citer : MicroPyramid™ (Figure 7) de NANOPASS TECHNOLOGIES (Israël) pour l'injection d'insuline, de vaccins… ou Pyraderm™ d'APOGEE TECHNOLOGY (USA) pour la délivrance de thérapeutiques diverses.

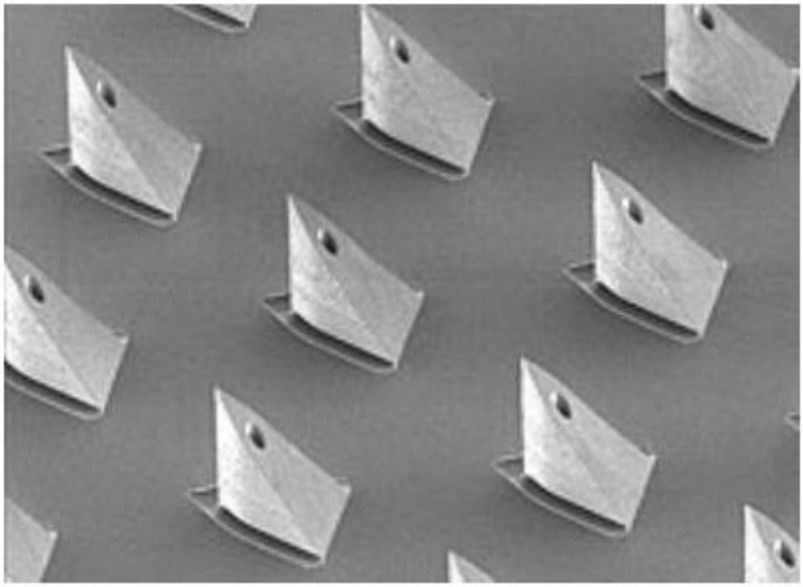


Figure 7 : Visualisation en MEB du système de microaiguilles « Micropyramid™ » de NANOPASS TECHNOLOGIES. Chaque pointe d'aiguille est constituée de cristaux de silicone purs. (×1500). www.nanopass.com

1.2. Soins des plaies

Depuis l'antiquité, l'argent est utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes. Ainsi, le nitrate d'argent entrait dans la composition de nombreux traitements contre les infections avant d'être détrôné par des particules d'argent métalliques colloïdales au milieu du XIX^{e} siècle. Depuis quelques années, devant la recrudescence des bactéries multirésistantes, l'argent renoue avec le succès, en raison de son large spectre d'activité antimicrobienne, antifongique et antivirale. Il offre une vraie alternative à l'utilisation des antibiotiques. On peut en trouver dans des gels, crèmes, poudres … mais surtout dans les pansements. Utilisés principalement pour les grands brûlés, ces pansements permettent d'éviter une surinfection de la plaie et améliorent le déroulement de la guérison (70).

Le mécanisme d'action exact est encore mal connu, car à la fois les ions et les nanoparticules d'argent ont des actions antibiotiques en milieu aqueux (71). Parmi les pansements contenant des nanoparticules, on trouve SilverIon™ d'ARGENTUM MEDICAL (USA) et Acticoat™ de SMITH & NEPHEW (Royaume-Uni). Le contact avec de l'eau ou l'exsudat permettrait la solubilisation de l'argent des nanoparticules (sous forme Ag^{0}) ou son ionisation (sous forme Ag^{+}). L'avantage de la forme nanoparticulaire par rapport au sel serait une vitesse de libération des ions argent plus importante et plus longue dans le temps (72). Pour comparer, le nitrate d'argent est libéré instantanément en milieu biologique et son activité ne dure que 2 heures, alors que l'Acticoat™ reste efficace jusqu'à 7 jours (73).

1.3. Cathéters

Depuis quelques années, la nanotechnologie a fait son apparition au niveau des cathéters notamment *via* des revêtements incorporant des nanoparticules d'argent, afin de limiter les risques de maladies nosocomiales (croissance des biofilms) (74). Les nouvelles procédures médicales nécessitent de plus en plus souvent l'utilisation de cathéters pendant des périodes de plus en plus prolongées. Ces derniers présentent des parois lisses et ultrafines, ce qui implique l'utilisation de matériaux de renfort conventionnels ne permettant pas la fabrication d'objets aussi fins. L'idée est donc d'utiliser des « nanorenforts », tels que des nanoparticules d'argile, de céramique ou des nanotubes de carbone. Incorporés dans une matrice polymérique, ils permettraient d'améliorer les propriétés mécaniques et physiques de ces matrices.

1.4. Chirurgie

Pour les instruments médicaux tels que les scalpels, un revêtement nanométrique composé de diamant permettrait des incisions plus fines et précises rendant l'acte moins invasif grâce à un plus faible coefficient de friction (75). En effet, la couche nanométrique de diamant entraine une faible adhérence aux tissus biologiques et donc une pénétration facilitée.

1.5. Diagnostic et surveillance

Divers projets voient le jour pour mettre au point des applications dans la surveillance ou le diagnostic de maladies. Pour les patients diabétiques, un dispositif de surveillance de la glycémie composé de nanotubes de carbone ou de graphène greffés par de la glucose oxydase capable de fluorescer en fonction de la quantité de glucose dans le sang (76) a été conçu par des chercheurs du *Massachuset Institute of Technology.* Le dispositif a pour vocation de pouvoir détecter un très faible taux de glucose (jusqu'à 3 µM) ce qui rendrait compatible les mesures directement dans la salive et ainsi éviter les piqures à répétition ainsi que leurs effets secondaires (perte de sensibilité digitale). Toujours selon les auteurs (77), il suffirait de modifier l'enzyme déposée sur le dispositif pour détecter beaucoup d'autres molécules.

Les dispositifs de diagnostic *in vitro (*DM-DIV) deviennent de plus en plus sophistiqués avec les biopuces génétiques ou les laboratoires sur puce (*lab on chip*) capables d'avoir une précision moléculaire. Les *lab on chip* font référence à des technologies qui permettent des opérations qui requièrent normalement un laboratoire mais dans une version miniaturisée. Le rôle des nanotechnologies a été crucial pour leur développement. En particulier *via* le dépôt à l'échelle nanométrique de surfaces nanométriques, ou la création de valves miniaturisées (78). Les nanosenseurs jouent aussi un rôle clé de ces systèmes (79). Ces senseurs sont développés grâce à l'utilisation de nanomatériaux, comme les NTC, capables de détecter de très faibles concentrations, pouvant même aller jusqu'à une molécule seule selon les cas. Ces puces peuvent être utilisées pour détecter un grand nombre de molécules, de l'ARN ou de l'ADN et pourront à terme être utilisées en routine dans les cabinets médicaux sans passer par un laboratoire d'analyse.

2. Dispositifs implantables

2.1. Greffons synthétiques

Pour aider au développement d'organes *in silico,* les cellules ont besoin d'une matrice extracellulaire similaire à celle de leur environnement direct dans le corps humain, tant en terme de forme que de densité. L'*electrospinning* est un procédé permettant de créer des membranes non tissées « nanofibreuses » à partir de polymères. Le dépôt des polymères se fait sur une plaque dite collectrice (Figure 8) et est réalisé sous l'effet d'un champ électrique suffisamment élevé. Ceci permet la création de nano-fibres personnalisables, tant en termes de forme (au niveau de la plaque collectrice), de taille des fibres, de type de polymère et autorise même la création de pores ou l'incorporation de nanoparticules dans le matériau final (80). La densité du produit peut être aussi modulée afin de mimer une structure tissulaire humaine (greffons vasculaires)

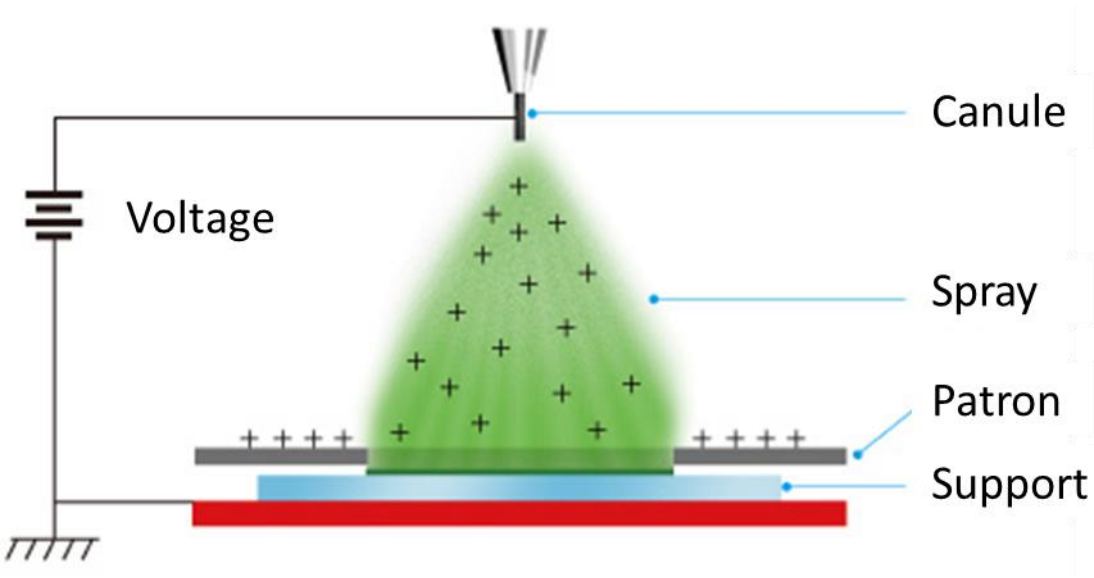


Figure 8 : Schéma de principe de l'électrospinning selon (80)

2.2. Stents

L'insuffisance coronarienne liée à des rétrécissements de la lumière des vaisseaux peut être traitée en pratiquant une angioplastie (geste thérapeutique permettant de dilater une artère au niveau d'un rétrécissement) suivie d'une implantation d'un stent qui permettra à l'artère de rester dilatée. Les stents sont des structures métalliques (acier, titane, ou alliages chrome/cobalt, nickel/titane…) ou polymériques (acide poly(lactique) principalement (81) qui finiront par être résorbés au bout de quelques mois). Une des principales limitations du

stent est la resténose intrastent due notamment à une réaction d'hyperplasie des cellules musculaires lisses (CML) de l'intima et aussi à un dépôt de protéines de la coagulation et de plaquettes. A terme, la resténose implique un nouveau geste chirurgical. Le but est donc de trouver des solutions viables à plus long terme pour le patient.

Actuellement sur le marché, il existe deux grand types de stents, les stents nus et les stents actifs (*Drug Eluting Stents* ou DES). Les stents nus n'ont qu'une action physique de dilatation sur le vaisseau alors que les actifs sont capables de libérer des médicaments à partir d'une matrice de polymère (paclitaxel, sirolimus …).

Le premier axe thérapeutique étudié a été de diminuer le risque de survenue de thromboses par modification de la surface des stents. Ainsi, la solution consiste à modifier le contact entre le stent et les cellules grâce à des revêtements nanométriques composés de polymères ou de céramique nanoporeux appliqués sur des stents nus. L'utilisation, par exemple, du Polyzene-F® (un dérivé des polyphophazènes (Figure 9)) comme revêtement de surface nanométrique de stents permettrait une hémocompatibilité (82). Ceci favoriserait une cicatrisation rapide et totale des vaisseaux lésés (83), ceci grâce à la réduction de l'activité plaquettaire au niveau du site d'implantation. Tout cela permet de réduire les réactions inflammatoires tissulaires à l'origine de la resténose grâce à leur action dite « passive » sur l'agrégation des éléments sanguins.

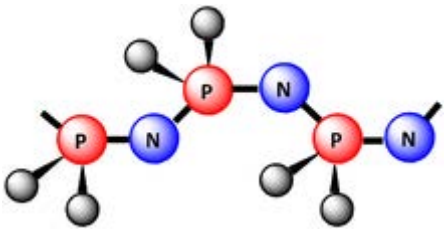


Figure 9 : Formule générale des polyphosphazènes

Malgré les innovations apportées en termes de modifications de surface, ces stents entrainent l'apparition de resténose à long terme car, à leur action physique de dilatation, n'est associée aucune action chimique permettant de la prévenir spécifiquement.

Les DES de première génération sont associés à un retard d'endothélialisation, un remodelage artériel, un dépôt persistant de plaquettes et de fibrine à la surface du stent, ce qui aboutit à une athérosclérose précoce (84). La principale amélioration des deuxièmes et troisièmes génération consiste en une meilleure biocompatibilité, une masse de polymères moins importante et surtout l'introduction de polymères biodégradables (*e.g.* acide

polylactique ou polycaprolactone) (85). La problématique de nanostructucturation de surface des stent ainsi que leur capacité à libérer des principes actifs fait partie intégrante de la partie expérimentale de ce travail et sera développé plus en détail en deuxième partie.

Il faut noter que les exemples cités ci-dessus ne sont qu'une petite partie de tous les DM incorporant des éléments nanométriques déjà sur le marché ou encore en développement. D'autres champs d'application voient leurs possibilités augmentées par les nouvelles solutions apportées par les nanotechnologies (nanorobots, greffons...)

2.3. Orthopédie

Une des opérations les plus réalisées en orthopédie consiste en la pose d'implants. Ces derniers sont posés pour une durée longue d'environ 10 à 15 ans (34) et les alliages choisis sont caractérisés par de bonnes propriétés mécaniques et une bonne résistance à la corrosion. Cependant, des descellements sont possibles et sont souvent attribués aux défauts présents à l'interface entre l'os et l'implant. Les modifications de surfaces, par la nanostructuration de ces dernières, permet de favoriser l'adhésion et la différenciation des cellules osseuses (86). Des revêtements en hydroxyapatite ou en phosphate de calcium contribueraient à la recalcification de l'os naturel au niveau de l'implant, à la fois grâce au caractère nanométrique de la topographie mais également au réservoir de matières premières de ces surfaces. Par exemple, les implants NanoTite™ contiennent des nanocristaux de phosphate de calcium (Tableau 1).

2.4. Autres dispositifs implantables

Actuellement, les progrès techniques réalisés rendent possible le remplacement d'un organe, comme le cœur, par un organe artificiel. Le développement et l'implantation chez un patient du premier cœur totalement artificiel (Figure 10) en 2013 par la société CARMAT a été une première mondiale. Cinq patients ont bénéficié de ce cœur artificiel. Malgré un arrêt prématuré de l'essai clinique visant à remplacer le cœur des patients, il s'agit d'une avancée majeure dans la confection d'organes artificiels. Les surfaces internes en contact avec le sang

sont recouvertes de biomatériaux synthétiques et biologiques hydrophobes (au niveau des valves cardiaques afin d'éviter une coagulation sur la surface, permettant une absence d'adhésion des éléments du sang), ou nanoporeux (à l'interface avec les veines et artères) pour assurer une adhérence des tissus biologiques protéiques. De plus, le système est rempli de capteurs miniaturisés qui permettent au cœur de s'adapter aux besoins physiologiques du patient, notamment lors d'activités physiques. Ce système prometteur nécessite encore quelques ajustements, notamment en ce qui concerne le suivi post-opératoire des patients afin d'éviter toute défaillance mécanique (batteries du cœur défaillantes) et/ou biologique (coagulation trop importante pouvant conduire à un accident vasculaire cérébral, un emphysème pulmonaire …)



Figure 10 : Visuel du cœur artificiel développé par CARMAT (http://www.carmatsa.com)

Parmi les autres dispositifs implantables majeurs, il existe un rein artificiel (Figure 11) composé de milliers de structures nanoporeuses capables d'arrêter sélectivement les toxines (87). Son principe repose une combinaison entre une membrane d'ultrafiltration associée à un bioréacteur composé de cellules de tubules rénaux humains capables de reproduire les fonctions métaboliques, endocrines et immunologiques d'un rein sain. Ces cellules sont cultivées sur des films de silicone nanoporeux (88, 89) le tout permettant de garder des

cellules mimant la fonction rénale tout en limitant le dépôt protéique et entraîner une perte minimale de protéines sanguines.

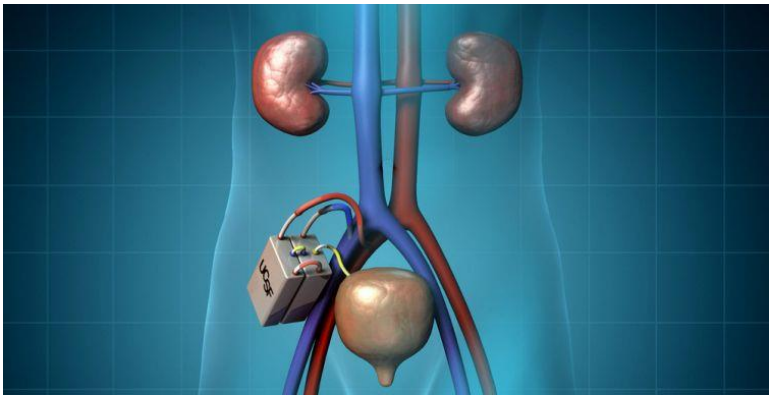


Figure 11 : Visuel du rein artificiel développé par l'Université de Californie (http://www.pharm.ucsf.edu/kidney)

On peut encore citer les projets de prothèses rétiniennes utilisant des nano-électrodes attachées à la rétine et capables de transmettre au nerf optique les informations enregistrées par une caméra externe. La rétine artificielle se substitue aux photorécepteurs. Concrètement, il s'agit d'implants (de 3 × 3 mm) fixés sur ou sous la rétine, composés d'électrodes qui stimulent électriquement les neurones rétiniens. Les premiers dispositifs testés dans les années 1990 incluaient 16 à 20 électrodes. Ils en comportent actuellement jusqu'à 1 500, ce qui implique une miniaturisation jusqu'à l'obtention de nanocapteurs. Plusieurs dispositifs sont en cours d'évaluation. Trois ont déjà obtenu le marquage des autorités européennes (marquage CE) - Argus II (Second sight, Etats-Unis), Retina Implant (AG, Allemagne) et IRIS II (Pixium Vision, France). Argus II a également obtenu l'agrément de l'agence américaine (FDA) et il est commercialisé en France.

2.5. Cancérologie

Les traitements actuels en cancérologie traditionnelle sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ici, les nanotechnologies n'interviennent pas *via* l'utilisation de dispositifs médicaux mais directement par l'injection de nanoparticules colloïdales. Des nanoparticules d'oxyde de fer permettent à la fois de localiser précisément une tumeur, mais aussi de la traiter grâce à la thermothérapie. Ces propriétés théranostiques (diagnostic + traitement combinés) sont dues non seulement à la taille nanométrique des particules, capables de pénétrer plus facilement à l'intérieur des cellules cancéreuses, mais aussi à leurs capacités à

restituer l'énergie magnétique transmise sous forme de chaleur et donc d'entrainer spécifiquement la mort des cellules cancéreuses (90). Enfin grâce à leur caractère métallique elles sont facilement observables avec divers techniques de visualisation.

Cependant cette partie ne concerne pas directement les dispositifs médicaux et ne sera pas traitée extensivement dans ce manuscrit.

2.6. Nanorobots en développement

Certains projets de DM invasifs actifs de taille nanométrique font appel à des capteurs ultra-sensibles (91), des moteurs autonomes, des ordinateurs moléculaires (92) … Les composants seraient biocompatibles et même biorésorbables (93). Selon les chercheurs, ces nanorobots pourraient être, à terme, capables de sonder une cellule à la recherche d'une éventuelle maladie puis de l'éliminer tout en préservant les cellules saines. La médecine passant à l'échelle, non plus macroscopique, mais nanoscopique. Enfin, la miniaturisation à l'échelle nanométrique des composants électroniques permettrait d'envisager le développement de système nano-électromécaniques contrôlés par ordinateur. Ces systèmes pourraient fournir des données biologiques mais aussi effectuer des chirurgies toujours moins invasives.

Les nanorobots peuvent jouer un rôle significatif en chirurgie. Ces derniers peuvent être facilement introduits chez le patient *via* le système vasculaire, ou d'autres cavités du corps humain. Un nanorobot programmé par un chirurgien pourrait agir de façon semi-autonome directement depuis l'intérieur du corps humain. De tels dispositifs pourraient réaliser diverses opérations comme chercher des anomalies spécifiques dans des organes puis corriger les éventuelles lésions par des nanomanipulations gérées par un ordinateur dirigé par le chirurgien (94).

2.7. Essais cliniques

Parmi les essais cliniques faisant intervenir des nanoparticules et des dispositifs médicaux, les études les plus significatives ont été recensées dans la Table 2. On peut remarquer encore une fois que les principaux champs d'application représentés sont la restauration dentaire où les nanoparticules (NP) joueraient un rôle antibactérien permettant

une meilleure implantation de la dent ou du matériau de comblement. Les NP permettent aussi d'obtenir des objets présentant une résistance améliorée par rapport au matériau ne présentant pas de nanostructuration. De plus leur propriétés optiques leur permettrait de fabriquer des objets avec une esthétique prononcée et durable.

Table 2 : Récapitulatif des essais cliniques intégrant des nanoparticules et des DM (extrait à partir du site internet clinicaltrials.gov)

Nom de l'étude	Type de DM	Type de nanoparticules	Statut de l'étude	But	Remarque
NANOM-FIM	Stent	Or-Silice Or-Silice-Fer	Complétée	Destruction de la plaque d'athérome par substitution du stent	Pas de nanostructuration du stent.
IABN	Ciment de comblement dentaire	Polyéthylèneimine	En cours (?)	Absence d'infection bactérienne à la suite d'implantation dentaire	
Antibacterial Nanoparticles Incorporated in Composite Restorations	Résine dentaire	Polyéthylèneimine alkylée	Complétée	Idem	
A Novel Magnetic Needle Using Iron Oxide Nanoparticles for the Detection of Leukemia	Aiguille magnétiques	Oxyde de fer	Arrêtée avant inclusion des patients	Identifier précisément une quantité minimale en cellules cancéreuses chez les patients atteints de leucémie	Les NP commerciales montraient beaucoup de variations. Etude abandonnée dans l'attente de lots de NP caractérisés et reproductibles
Altrazeal Range of Motion Study Comparing With Typical Carboxymethyl (ROM)	Pansements / hydrogels	Nanoflex® NP (nom commercial)	Interrompue (manque de patients)	Améliorer le traitement des brûlures par rapport aux pansements classiquement utilisés (ici Aquacel AG®)	Déjà sur le marché, mais sans approbation de la FDA. Vente libre sur internet. Pas d'information sur les nanoparticules utilisées.
A Sunscreen Based on Bioadhesive Nanoparticles	Crème solaire	NP bioadhésives	En cours	Montrer l'amélioration du facteur de protection solaire	
SNOOPY2 Exhaled Breath Olfactory Signature of Pulmonary Arterial Hypertension	Nez artificiel	AuNP	En cours	Détecter les composés organiques volatiles dans l'air expiré des patients pour détecter l'hypertension artérielle pulmonaire	
Wear Characteristics of Denture Teeth	Dent artificielle	Non détaillé	Interrompue	Fabriquer des dents artificielles composées de nanoparticules et de composites hybrides plus résistantes que leur pendant en résine	

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'une nanoparticule, grâce à sa très petite taille et à sa surface spécifique importante voyait sa réactivité accrue. Si cette caractéristique peut poser un désavantage pour éviter une adsorption protéique, elle peut s'avérer très intéressante dans l'optique de greffer des principes actifs à la surface de ces particules. Une fois fonctionnalisées et placées à la surface d'un DM, elles seront capables de libérer de façons plus ou moins contrôlée ce principe actif. L'association des nanotechnologies, des principes actifs et des DM pourra aboutir à terme à un nouveau genre de DM actifs.

La partie expérimentale de ce manuscrit décrit la formation de revêtements modèles applicables à des stents, leur caractérisation ainsi que l'étude de leur biocompatibilité et a fait l'objet d'une publication parue en 2017 dans le journal « *Particle and Particle Systems Characterisation* » (95).

PARTIE EXPERIMENTALE

V ETAT DE L'ART

1. Maladies cardiovasculaires et ischémiques

En France, 18 % des décès sont attribués aux pathologies cardiovasculaires ischémiques et représentent aussi la première cause de décès prématurés dans le monde selon l'institut national de veille sanitaire (INVS) (96) . Dans 80 % des cas, il s'agit d'un accident ischémique conduisant soit à un accident vasculaire cérébral, soit à un infarctus du myocarde. Le pronostic de cette dernière pathologie reste effroyable avec 15 % de personnes qui décèderont dans les heures ou les jours qui suivent et 15 % dans l'année suivante. De plus, la prévalence mondiale des maladies ischémiques étant en augmentation (prévision de plus de 10 % en 2030), le surcoût lié aux séquelles a été estimé aux Etats-Unis à 818 milliards de dollars pour les coûts directs et la baisse de productivité (liée au handicap) est projetée à 276 milliards de dollars (97).

Dans ces pathologies, la prise en charge d'urgence repose premièrement sur la thrombolyse et/ou l'angioplastie, puis dans un second temps sur les mesures hygiéno-diététiques. L'angioplastie, quant à elle, consiste à détruire l'obstacle situé dans l'artère et elle est souvent suivie (70 % des cas) par la pose d'une endoprothèse ou stent (Figure 12) afin que le vaisseau endommagé retrouve son diamètre d'origine. Cependant malgré cela, au cours du temps, une resténose (rétrécissement du diamètre du vaisseau) peut apparaître au niveau du site d'implantation chez 20 à 30 % des patients pouvant nécessiter une nouvelle intervention (98).

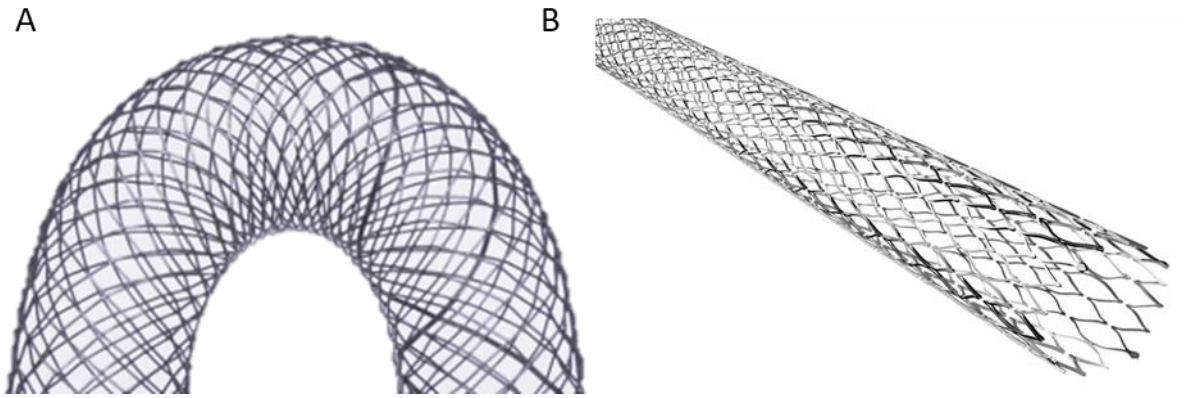


Figure 12 : Exemple de stents. A : stent dit « tressé » en alliage Nitinol® (nickel-titane) de la société Nimesis. B : stent en acier inoxydable obtenu par découpe laser.

2. Stents nus et stents actifs

En 2014, près de 150 000 stents ont été posés en France (99). Ces endoprothèses sont constituées d'un fil métallique (acier inoxydable ou alliage) tressé ou découpé au laser (Figure 12). Les stents uniquement en métal ou en alliage, dits « nus », ont une action physique sur la zone lésée (augmentation du diamètre vasculaire), mais ils n'ont aucune action sur les phénomènes biologiques impliqués dans la resténose. Dans cette pathologie, l'utilisation de principes actifs en administration systémique a conduit à des échecs par manque de ciblage de la zone lésée et en parallèle l'induction d'effets secondaires.

La nécessité d'une biocompatibilité de plus en plus poussée ainsi que l'absence effective d'apparition d'effets secondaires, même à long terme, a entrainé le développement de stents actifs (100). Les DES ont la particularité d'associer un revêtement polymérique (éthylène acétate de vinyle, méthacrylate de butyle, acide polylactique…) avec la libération d'un PA contenu à l'intérieur de ce dernier. Le PA est libéré progressivement tout en laissant le polymère à la surface du stent. Dans certains cas, lorsque le polymère utilisé est biodégradable, seul le stent nu reste présent à long terme (84).

Parmi les PA utilisés, deux grandes familles sont remarquables, les antinéoplasiques avec comme chef de file le paclitaxel, et les immunosuppresseurs avec entre autres, le sirolimus, le tacrolimus ou l'everolimus. Le but est d'inhiber la prolifération et la migration des CML ainsi que la formation d'une matrice extracellulaire à la surface du stent. On distingue sur le marché 3 générations de DES :

- DES de première génération : la structure des stents est en acier associée à une libération de sirolimus ou de paclitaxel (CYPHER™, TAXUS™).
- DES de deuxième génération : la structure est composée d'un alliage cobalt-chrome ou platine-chrome avec une libération d'éverolimus ou de zotarolimus (XIENCE™, PROMUS™ …) ;
- DES de troisième génération : utilisation de polymères biodégradables (BIOMATRIX™, ORSIRO™).

Malgré ces innovations, des problèmes de thrombose et de resténose peuvent apparaitre au niveau du site lésé (101) chez 16 à 42 % des patients (98). Même si ces dernières ont apporté une amélioration du taux de resténose et limitent le nombre d'interventions de nouvelle revascularisation, elles restent, d'après la Haute Autorité de Santé (HAS), sans effet sur la diminution à plus long terme du nombre de décès ou des infarctus du myocarde.

3. Resténose et donneurs de monoxyde d'azote

La resténose est définie comme la perte d'au moins 50 % du diamètre de la lumière artérielle par rapport au diamètre artériel post-pose du stent (98), le diagnostic étant posé suite à une exploration par angiographie. Il s'agit d'un phénomène multifactoriel (Figure 13) dont les principales étapes sont décrites ci-dessous par ordre chronologique (102, 103) :

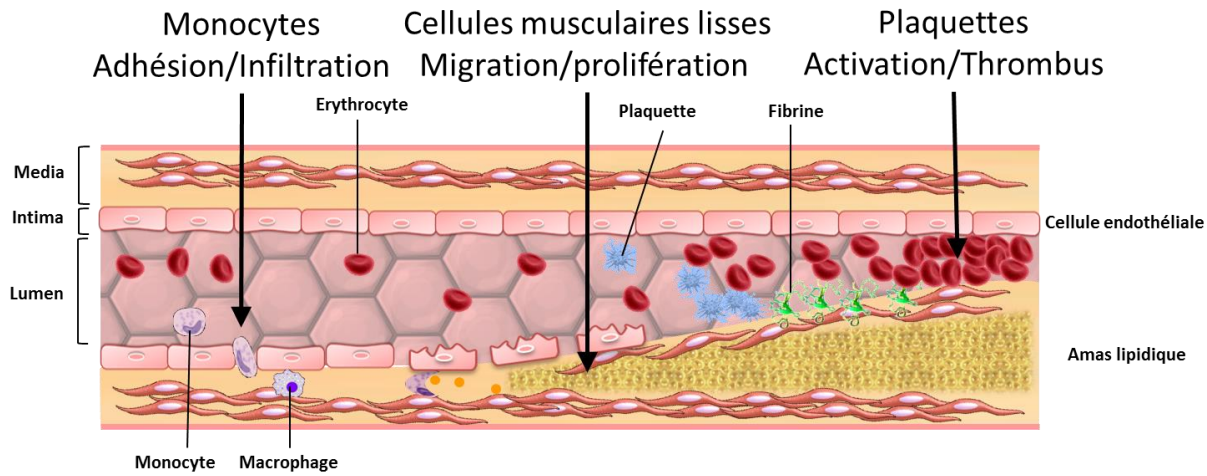


Figure 13 : Schématisation des différentes étapes conduisant à la resténose.

- A court terme :
    - Dommage au niveau de l'endothélium : inévitablement lié à l'acte chirurgical et garant de sa bonne qualité. Mais ceci entraine une détérioration des trois couches du vaisseau (intima, media et adventice).
    - Formation d'un thrombus :
        - En raison des dommages occasionnés sur l'endothélium, des protéines plasmatiques (dont le facteur von Willebrand et le fibrinogène) adhèrent sur la media. De plus, le sous-endothélium est directement

mis en contact avec le sang exposant différentes protéines (dont la fibronectine et la laminine) provoquant activation, adhésion et agrégation plaquettaire.

- En parallèle l'endothélium endommagé, les plaquettes et le stent recrutent et activent les polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages.
- Le thrombus apparait rapidement après la pose d'un stent et il va agir comme une matrice qui sécrète des facteurs visant à recruter les CML issues de la media entrainant ainsi la formation d'une hyperplasie néointimale.

- A moyen et long termes
  - Activation des CML en réponse aux facteurs de croissance et cytokines produits par les plaquettes, les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages ainsi que par les polynucléaires neutrophiles.
  - Formation néointimale : en parallèle d'une migration et d'une prolifération incontrôlée, les CML recrutées vont à leur tour synthétiser une matrice et du collagène.
  - Remodelage : la formation néointimale croît pendant les trois premiers mois suivants la pose du stent puis elle se stabilise et une réduction de cette structure est observée après 6 mois.
  - Résolution de l'inflammation : elle est retrouvée à toutes les étapes du processus en raison du traumatisme causé et de la présence d'un corps étranger. Il en résulte la mise en place d'une fibrose cicatricielle au niveau de la media et de l'adventice.

Partant de ce constat, un cahier des charges du principe actif le plus adapté a été établi et ses propriétés sont les suivantes (102) :

- Lipophilie de la molécule avec une bonne rétention tissulaire.
- Elution « douce » mais prolongée à partir du stent.
- Propriétés spécifiques de ce principe actif évitant les risques de thrombose et de resténose :
  - Effet antiprolifératif vis-à-vis des CML (sans induction de la mort cellulaire).

- Effet de recrutement des cellules endothéliales afin de reformer l'endothélium.
- Effet anti-inflammatoire.
- Effet antiagrégant plaquettaire.

Ainsi le monoxyde d'azote (NO), un gazotransmetteur radicalaire naturel de l'organisme caractérisé par une très faible demi-vie (de l'ordre de la seconde), possède des propriétés similaires, qui, à sa concentration physiologique, concordent avec le cahier des charges défini. Des donneurs de NO, les *S*-nitrosothiols (RSNO), dont certains naturellement présents dans l'organisme, ont déjà été utilisés sur des stents (50, 104, 105). Dans ces études, l'incorporation du RSNO a été réalisée dans un système monolithique : la matrice de polymère contenant le principe actif étant solidifiée autour du dispositif. Un maximum de 28 j de libération a été obtenu (105). Des propriétés anti-thrombogéniques ainsi que de non adhésion/non activation plaquettaires ont aussi été mises en évidence (50, 104, 105).

Ceci prouve l'intérêt des RSNO dans cette indication même si la période couverte par la libération de NO reste toutefois insuffisante pour favoriser la ré-endothélialisation de la zone lésée (> 6 semaines) et limiter le risque de resténose (51, 104). Cela signifie qu'il faut une formulation adaptée à un réservoir de RSNO capable d'être libéré sur de plus longues périodes.

4. Stratégie de fonctionnalisation de la surface des stents

La fonctionnalisation de surface est un domaine promettant un large champ d'applications. Les matériaux dont la surface a été modifiée sont utilisés dans beaucoup de domaines : électronique, énergie, industrie textile,… En ce qui concerne le domaine biomédical, ils sont utilisés comme biocapteurs, réservoirs de principes actifs ainsi que sur des dispositifs médicaux (106), implantables ou non. Il existe différents moyens pour introduire des modifications en surface. Par exemple, la fabrication de films multicouches, décrite par Decher (107), consiste en un dépôt alternatif de polyélectrolytes de charges opposées à la surface d'un matériau. Cette adsorption successive de polycations/polyanions sur un matériau entraine l'apparition d'une nouvelle surface, possédant une charge (correspondante au dernier polyélectrolyte déposé) due à une surcompensation des charges de surface. (Figure 14). Ce changement confère de nouvelles propriétés à la surface traitée (106).

Les matériaux les plus utilisés pour la construction des films multicouches sont principalement des polymères synthétiques chargés positivement ou négativement.

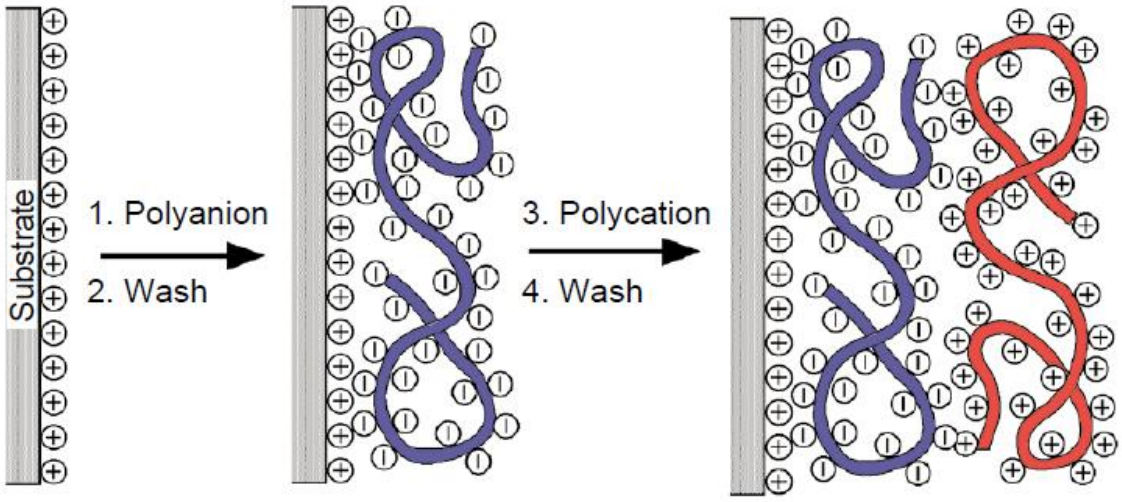


Figure 14 : Schématisation de la méthode de fabrication d'un film multicouche (selon (Decher-1997)).

Un des avantages de la technique des films multicouches est le large choix de matériaux sur lesquels peuvent être déposés ces films (verre, céramique, polymères, métaux, …). Un deuxième avantage consiste en la possibilité de piéger au sein des couches de polymères des PA (108) qui pourront être libérés de manière contrôlée et prolongée dans le temps soit par diffusion du principe actif hors de la matrice soit par destruction du film (Figure 15 a et b). Ainsi, une libération contrôlée sur cinq semaines a été obtenue à partir de films multicouches piégeant des molécules modèles (kétoprofène et cytochalasine D) (109). Cependant, la couche la plus externe composée de polymères cationiques peut présenter un inconvénient non négligeable car peu biocompatible en raison d'une éventuelle interaction électrostatique entre les charges positives du polymère et les membranes cellulaires négatives (110).

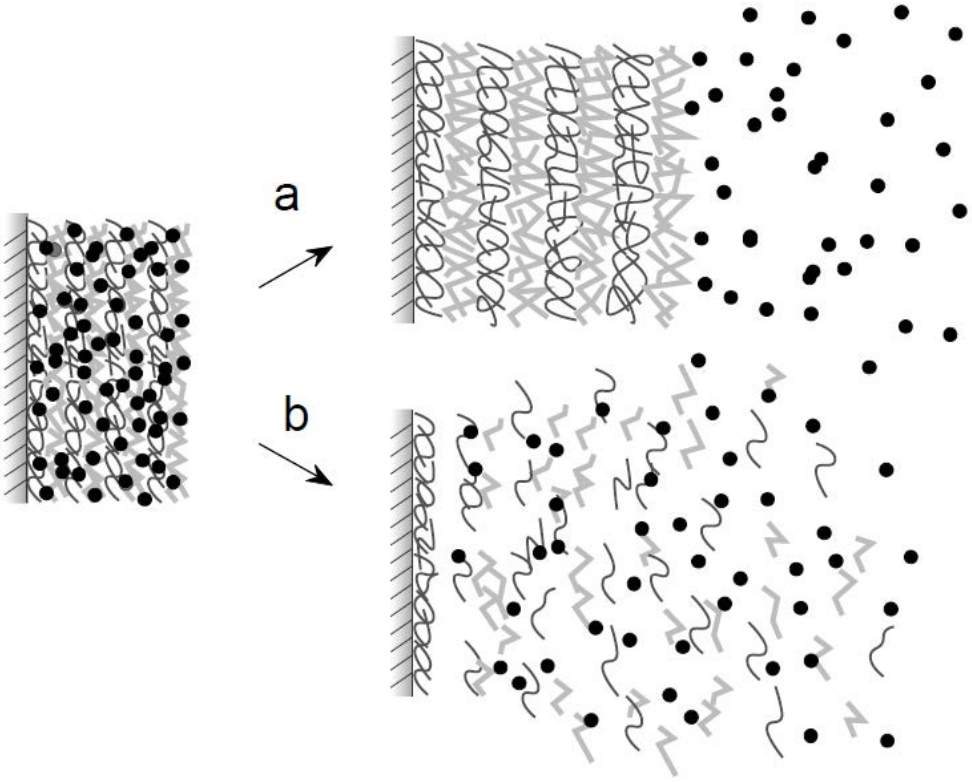


Figure 15 : Schéma de la libération d'un principe actif piégé dans un film multicouche. (selon (108)).

Maintenant et ainsi qu'il a été précédemment décrit, de plus en plus de micro- ou nano-particules sont intégrées dans ces films dans le but d'obtenir des surfaces micro- ou nano-fonctionnalisées. Ceci permet, dans certains cas, d'avoir une charge utile en principe actif plus importante et de stabiliser les molécules les plus sensibles (protéines ou acides nucléiques). Beaucoup de nanoparticules organiques ou inorganiques ont déjà été intégrées au sein de films.

5. Objectif du projet

Le projet vise à obtenir une libération de NO prolongée à partir d'un stent. Différents points sont à analyser pour mener à bien ce projet : le type de donneur de NO, le moyen de constituer un réservoir du principe actif et d'obtenir un profil de libération prolongée dans le temps.

Concernant le type de donneur de NO, comme mentionné précédemment, le radical doit être apporté par une pro-drogue car il est caractérisé par une demi-vie de quelques secondes. Il en existe différentes classes :

- Les nitrates organiques dont certaines molécules sont commercialisées tels que la trinitrine (ou nitroglycérine) ou le dinitrate d'isosorbide, libèrent NO après une action enzymatique impliquant une déplétion des réserves redox intracellulaires.
- Les diazeniumdiolates (ou NONOates) qui ont la capacité de se décomposer en NO sans subir de biotransformation mais qui ont l'inconvénient d'épuiser à terme le stock de thiols endogènes.
- Les RSNO qui sont, pour certains, des composés endogènes (*S*-nitrosoglutathion, *S*-nitrosocystéine, *S*-nitrosoalbumine, …) et qui sont caractérisés par une faible demi-vie (45 min (111)). Ils peuvent se décomposer pour libérer NO grâce à l'action d'enzymes (par exemple la thiorédoxine) ou par l'action de thiols de faible masse moléculaire ou de cations divalents (Cu^{2+}) (limitant ainsi le risque de déplétion des réserves redox des cellules). Les RSNO seront les pro-drogues choisies dans le présent travail.

Malgré le potentiel que pourrait présenter les RSNO dans la libération de NO à partir d'un stent, il faut développer un système qui permette à la fois de constituer un réservoir de principe actif suffisant et d'obtenir une libération fortement prolongée de la molécule.

Dans ce projet, des nanoparticules d'or (AuNP) fonctionnalisées, ayant fait l'objet de travaux au sein de l'EA 3452 CITHEFOR (27, 112-114) seront fonctionnalisées en surface par une grande quantité de RSNO afin de constituer un réservoir de principe actif. Les nanoparticules d'or font partie des nano-objets les plus étudiés de nos jours et certaines sont en cours d'étude clinique. Elles possèdent l'avantage d'être faciles à synthétiser tout en obtenant des objets de taille reproductible. De plus, elles peuvent être facilement fonctionnalisées avec des principes actifs selon des rendements élevés conférant une charge utile importante de la particule en principe actif (115).

Afin d'obtenir une libération prolongée de principe actif à partir de ces AuNP (caractérisées par une charge de surface négative), celles-ci seront piégées entre les couches de polyélectrolytes. Cette approche a déjà fait ses preuves dans la littérature pour charger de

grandes quantités de principes actifs ainsi que pour les libérer à une faible concentration sur une période prolongée dans le temps.

Ici, la diffusion d'espèces dénitrosantes (cations divalents, …) à travers les différentes couches entrainera la libération de NO par clivage de la liaison soufre-azote des RSNO. Enfin, afin d'éviter le relargage des AuNP dans la circulation sanguine, réduisant d'autant réserve en NO, des polyélectrolytes biocompatibles mais non biodégradables seront choisis. De ce fait, ce projet propose une approche originale constituée par des dépôts multicouches de polymères successivement chargés négativement et positivement permettant une libération prolongée, par diffusion passive de NO à partir d'un réservoir (AuNP fonctionnalisées).

Pour étudier et évaluer la construction de tels films, des « prototypes » seront utilisés. Ces films multicouches, composés de couches de polyélectrolytes alternativement cationiques et anioniques entre lesquelles seront enchâssées des AuNP modèles (AuNP non fonctionnalisées), seront déposés sur deux types de supports. Un premier constitué d'une lamelle de verre permettra d'évaluer la faisabilité de la méthode et de caractériser les films dans des conditions statiques. Ce système offre l'avantage d'un montage simple et permet de réaliser rapidement la caractérisation du film. Le deuxième modèle fait intervenir l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ). Les films seront déposés sur la paroi interne d'un capillaire en verre. Ceci mène à la formation de films soumis à des flux et mime donc plus précisément les différents mécanismes influant sur leur stabilité.

VI MATERIEL ET METHODES

1. Réactifs et étalons

Différents supports sont utilisés pour préparer les films : les stents en alliage nickel-titane (Nitinol®) constitués d'un fil tressé d'un diamètre de 0,22 cm (fournis par la société Nimesis Technology - 57245 Mécleuves - France) et des supports en verre : des lamelles (24 × 36 × 0,145 mm) et des lames (76 × 26 × 2 mm) qui proviennent de chez Menzel-Glazer.

Les polymères : le chlorhydrate de polyallylamine ((PAH) – masse molaire moyenne 15 000 g/mol, pKa = 10) et l'acide polyacrylique ((PAA) – masse molaire moyenne 15 000 g/mol, pKa = 4,5), le fibrinogène, l'albumine bovine sérique (BSA), l'acide 2, 2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), la solution de tampon phosphate (PBS) (0,148 M, pH = 7,4, constituée de 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,9 g/L NaH_2PO_4, 0,2 g/L KH_2PO_4) et le glutathion réduit (GSH) proviennent de chez Sigma France. Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) provient de chez Eurobio. Tous les solvants et les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau ultra-pure déionisée (résistivité supérieure à 18,2 MΩ.cm).

Les nanoparticules d'or (AuNP) en suspension, stabilisées par les ions citrate, sont synthétisées au laboratoire selon le protocole décrit par (112). A température ambiante, 1,0 mL d'$AuCl_4$ - 3(H_2O) à 1 % (m/v) dans l'eau est ajouté à 90 mL d'eau. Après 1 min d'agitation, 2,0 mL de solution aqueuse de citrate de sodium à 38,8 mM sont ajoutés. Après 1 min, 1,0 mL de $NaBH_4$ à 0,075 % (m/v), fraîchement préparé dans l'eau, est ajouté. Le milieu est agité pendant 5 min. Les AuNP sont stockées à 4 °C pendant 1 mois maximum. D'après des analyses précédemment effectuées, ces nanoparticules présentent un diamètre de cœur de 5,3 nm, un diamètre hydrodynamique de 7,3 nm et sont chargées négativement avec un potentiel zêta de surface de - 51 mV (112).

Le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) provient de GIBCO (In-vitrogen, Cergy Pontoise, France).

2. Préparation des films

Les différents supports utilisés pour le dépôt des films sont prétraités : pour cela, ils sont nettoyés dans une solution de SDS 0,1 M à 100 °C pendant 15 min puis rincés à l'eau. Ils sont ensuite plongés dans une solution de HCl 0,1 M à 100 °C pendant 15 min, rincés et enfin séchés.

Les solutions de polyélectrolytes (Figure 16) (0,1 M en accord avec la masse molaire des monomères) sont préparées extemporanément dans du PBS. Le pH est ajusté à 7,4 par de l'HCl 1,0 M pour la solution de PAA.

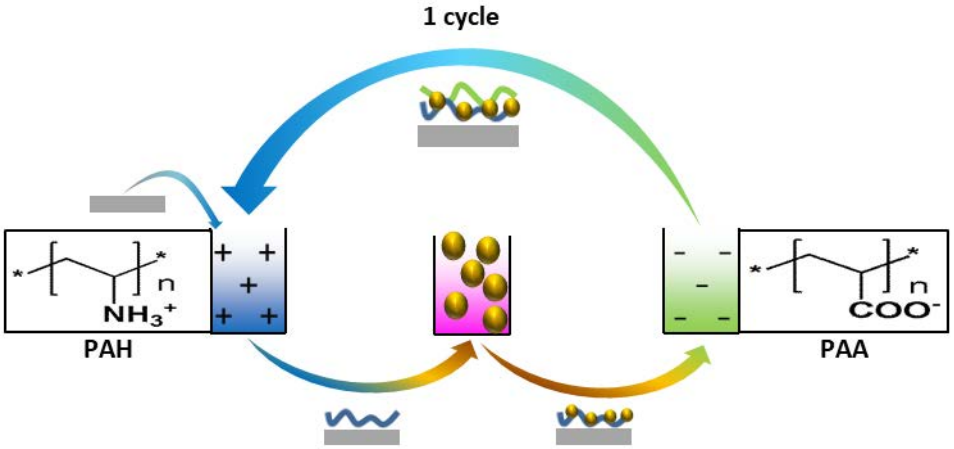


Figure 16 : Processus de fabrication des films multicouches de polyélectrolytes piégeant des nanoparticules d'or.

La fabrication des films multicouches (Figure 16) de polyélectrolytes piégeant des AuNP est un processus multi-étapes. Le support prétraité est tout d'abord plongé dans la solution de PAH pendant 10 min puis rincé *via* deux bains successifs de PBS (respectivement 2 min et 1 min). Puis il est plongé dans la suspension de d'AuNP pendant 10 min, rincé comme décrit précédemment et trempé dans la solution de PAA pendant 10 min, rincé puis séché. Ces trois étapes correspondent à un cycle ([PAH/AuNP/PAA]). Les films multicouches ont été obtenus par répétition de ces étapes jusqu'à obtention de trois cycles ($[PAH/AuNP/PAA]_3$) qui seront notés « *PAA* » eu égard à la composition de la dernière couche de polyélectrolytes déposée. La couche la plus externe peut donc varier tout en conservant trois couches d'AuNP. Le dernier bain des supports peut être soit du PAH ($[PAH/AuNP/PAA]_3$-PAH) soit des AuNP ($[PAH/AuNP/PAA]_2$-PAH/AuNP) respectivement notés « *PAH* » et « *AuNP* ». Pour certains supports utilisés notamment dans l'observation en microscopie à force atomique (AFM) et pour le dosage d'or, 20 cycles ont été réalisés.

3. Caractérisation des films

3.1. Stabilité

Les spectres d'absorbance (400-700 nm) des lamelles recouvertes par des films multicouches (*vs*. une lamelle nue prétraitée) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre UV-visible modèle UV-1800 (Shimadzu). Pour les études de stabilité, les lamelles sont gardées dans deux conditions : soit à sec à 4 ± 4 °C soit dans un incubateur à 37 ± 1 °C incubées dans 10 mL de PBS (filtré sur 0,22 µm). A intervalles de temps réguliers, un spectre d'absorbance est réalisé. D'autres tests de stabilité ont été réalisés sur des lamelles recouvertes de films multicouches placées dans des solutions de pH (utilisation de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M) ou de force ionique (NaCl de 0,5 à 2,0 M) variables.

3.2. Microscopies

Pour la microscopie électronique à transmission (MET), les films ont été déposés sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone (Agar) selon le protocole précédemment décrit tout en diminuant le temps d'incubation à 3 min et en ajoutant un dernier lavage à l'eau pendant 1 min. Puis des clichés ont été réalisés par un Philips CM20 utilisant une cathode LaB6 travaillant à 200 kV. Le diamètre moyen des AuNP a été calculé pour chaque condition en mesurant le diamètre de 200 particules à partir des clichés obtenus. Pour l'AFM, les stents et les lames recouverts ont été analysés à sec et afin d'étudier leur topographie de surface avec mesure de rugosité. Certaines lames recouvertes par des films multicouches ont été immergées dans du PBS pour l'analyse (appareil : MFP3D-BIO - Asylum Research Technology, Atomic Force F & E GmbH, Mannheim, Germany). Les images obtenues en AFM ont ensuite été traitées *via* le logiciel WSxM 5.0 Develop 7.0.

3.3. Electrophorèse capillaire de zone

Toutes les expérimentations ont été réalisées sur un appareillage Beckman P/ACE 5500 (Beckman, Fullerton USA) équipé d'un détecteur UV réglé à λ = 214 nm en mode de polarité normale avec une injection du côté anodique (un temps négatif indique une polarité inversée). La température du capillaire est réfrigérée à 25 °C. Un capillaire non traité en silice de diamètre interne 50 µm et de longueur totale 37 cm (longueur effective 30 cm) a été

employé. L'alcool benzylique (marqueur de neutre, 0,1 $mg.mL^{-1}$ dans le tampon de migration) a été injecté en mode hydrodynamique (10 s sous pression 0,5 psi) a 10 kV. La mise en place expérimentale, l'acquisition des données et leur exploitation ont été réalisées grâce au logiciel Beckman P/ACE Station. Du PBS dilué au $1/10^{ème}$ a été utilisé comme tampon de migration. Chaque nouveau capillaire a été rincé avec du NaOH 1,0 M (20 min) et de l'eau ultrapure (20 min). Chaque injection a été réalisée en triplicat, et la moyenne des résultats est présentée, avec un écart type toujours inférieur à 3,0 %. Les solutions de polyélectrolytes utilisées pour recouvrir la surface interne du capillaire sont celles présentées dans la section « préparation des films ». Brièvement, pour chaque couche, le capillaire est rempli par la solution de recouvrement (PAH ou AuNP ou PAA) à 20 psi pendant 3 minutes puis rincé avec la même solution à 0,5 psi pendant 30 minutes. Entre chaque couche, l'alcool benzylique a été injecté 3 fois, et avant chaque injection le capillaire est rincé successivement avec de l'eau ultrapure (2 min) et du tampon de migration (3 min). La mobilité du flux osmotique (FEO) est déterminée à l'aide du temps de migration (TMN) du marqueur de neutre et de l'équation 1 :

$$FEO = \frac{L \times l}{TMN \times V} \quad (1)$$

Où L et l sont la longueur totale et apparente du capillaire et V le voltage appliqué.

Dans une seconde partie d'expérimentations, des échantillons de plasma dilués à 20 % dans le tampon de migration ont été injectés pendant 5 minutes à la pression de 20 psi. Puis le capillaire a été rincé avec du tampon de migration et la charge de surface du capillaire évaluée par trois injection de marqueur de neutre. Le capillaire a été rincé avec une solution de NaOH 1,0 M (20 min) et de l'eau ultrapure (20 min) pour retrouver la surface de silanol initiale.

3.4. Quantification de l'or

La quantification de l'or a été réalisée selon le protocole décrit par Tournebize *et al* (112) avec de légères modifications. Les lamelles de verre recouvertes par des films multicouches sont réduites en morceaux grâce à un pilon puis transférées dans un flacon. Puis 1,0 mL d'une solution oxydante (HCl 1,0 M, NaCl 2,6 M et Br_2 0,035 M) a été ajouté. Après 20 min sous agitation à 20 ± 2 °C puis 1 h à 60 ± 1 °C, l'or est quantifié. L'analyse est menée

de la manière suivante : 0,5 mL de la solution résultant de l'oxydation (ou 0,5 mL d'eau ou de réactif étalon) est ajouté à 9,5 mL d'eau. Puis, 2,5 mL d'HCl 6,0 M, 5,0 mL de NH_4Cl à 30 % (m/v) et 2,5 M de Rhodamine B à 0.84×10^{-3} M dans l'eau sont ajoutés. Enfin, 5,0 mL d'éther diisopropylique sont ajoutés et la solution est agitée pendant 30 s au vortex. L'absorbance de la phase organique contenant la paire d'ions est analysée en spectrophotométrie à 565 nm (*vs.* une droite d'étalonnage réalisée à partir de $AuCl_4^-$ de 6 à 30 µM). Le nombre d'atomes d'or par AuNP (n_{atome}) est déterminé en utilisant la taille moyenne d'une particule déterminée en MET. En partant de l'hypothèse que les particules ont une forme sphérique ainsi qu'une structure cristalline de type cubique à face centrée, n_{atome} a été calculé en utilisant l'équation :

$$n_{atome} = \frac{N_A \pi \rho D^3}{6M}$$

Où N_A correspond au nombre d'Avogadro ($6{,}022 \times 10^{23}$), ρ la densité de l'or selon une structure cubique à face centrée (19,3 $g.cm^{-3}$), D le diamètre moyen des AuNP en cm et M la masse molaire de l'or (197 $g.mol^{-1}$). Puis le nombre de nanoparticules par litre (n_{AuNP}) a été calculé selon l'équation :

$$n_{AuNP} = \frac{C_{AuCl_4^-} \times N_A}{n_{atome}}$$

Où $C_{AuCl_4^-}$ correspond à la concentration calculée par spectrophotométrie.

Ce nombre d'AuNP est ensuite rapporté à la surface de film en cm^2 correspondant à l'aire de deux rectangles dans le cas des lamelles (les deux faces sont recouvertes) ou d'un cylindre dans le cas des stents.

Pour les lamelles, le dosage d'or a été réalisé pour 3 couches de polymères et AuNP déposées et 20 couches le dosage sur les stents.

3.5. Profil antioxydant et biocompatibilité des films

Dans les expériences suivantes, la dernière couche du film est composée soit de PAH (polymère cationique), soit de PAA (polymère anionique), soit d'AuNP.

3.5.1. ***Réactivité avec un radical et le glutathion réduit***

La capacité antioxydante des films a été évaluée par un essai de décoloration avec le radical de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique) ($ABTS^{\bullet+}$). Vingt milligrammes d'ABTS sont dissous dans une solution de $K_2S_2O_8$ (1,7 mM dans le PBS). Après incubation à 4 °C pendant une nuit, la concentration en $ABTS^{\bullet+}$ est déterminée par spectrophotométrie (734 nm, ε = 1,5 x 10^4 $M^{-1}.cm^{-1}$). Les lamelles recouvertes par des films multicouches sont plongées dans du PBS pendant 1 h à température ambiante puis incubées à l'abri de la lumière pendant 2 h dans 10 mL d'$ABTS^{\bullet+}$ à 50 µM. Puis l'absorbance de la solution est mesurée à 734 nm. L'expérience est réalisée en triplicata et le résultat est exprimé en pourcentage du radical restant dans la solution. Un contrôle positif est obtenu en ajoutant 5 mg de glutathion réduit (GSH), un antioxydant contrôle, à 50 µM d'$ABTS^{\bullet+}$.

Dans un bain à 37 ± 1 °C, les lamelles recouvertes par des films multicouches sont équilibrées pendant 1 h dans du PBS puis incubées pendant 2 h dans 10 mL d'une solution de GSH à 10 µM. La quantité restante de GSH dans la solution après incubation a été déterminée par la méthode d'Ellman. Pour cela, 200,0 µL d'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoique) (1 mM du PBS, pH 7,4) sont ajoutés à 1,0 mL d'échantillon. Ce mélange est incubé pendant 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière puis l'absorbance est mesurée à 412 nm. La gamme d'étalonnage est obtenue à partir d'une solution de GSH (3,25 mM dans HCl 0,1 M) diluée dans du PBS, pour des concentrations allant de 3,25 à 32,5 µM.

3.5.2. ***Réactivité avec les protéines.***

Les lamelles recouvertes par des films sont équilibrées pendant 1 h à 37 ± 1 °C puis incubées pendant 2 h dans une solution de BSA (40 g/L dans du PBS) ou de fibrinogène (2 g/L dans du PBS). La quantité de BSA restante dans la solution est mesurée par spectrofluorimétrie (λ_{ex} : 278 nm/ λ_{em} : 340 nm, fentes : 5 nm, linéarité de 50 à 1000 µg/mL, spectrofluorimètre FP-8300, Jasco). Pour le fibrinogène, une quantification dans la solution à l'aide de l'acide bicinchoninique (BCA) a été réalisée (utilisation en accord avec le kit BCA – ProteinAssay™ – Pierce – Life Technology, linéarité de 50 à 1000 µg/mL).

3.5.3. ***Interaction avec les cellules***

Les monocytes humains (lignée THP-1-ATCC®-PIB-202™) mis en culture à 37 ± 2 °C et à 5 ± 1 % de CO_2 dans un milieu RPMI supplémenté avec 10 % (v/v) de SVF, 10 mg/mL de streptomycine, 10000 U de pénicilline, 1 % (v/v) de pyruvate de sodium et 2 % (v/v) de glutamine, sont ensemencés 48 h avant manipulation, à 3.10^5 cellules/mL dans des flacons en polypropylène. Elles sont ensuite incubées pendant 24 h ou 48 h à 37 ± 2 °C et à 5 ± 1 % de CO_2 au contact des lamelles recouvertes des films multicouches. La viabilité cellulaire a été vérifiée au bout de 24 et 48 h d'exposition *via* un test au bleu Trypan. L'expression des gènes suivants a été étudiée : neutrophil cytosolic factor 1 (*ncf*-1) et interleukine 1β (*il*-1β). Après 24 h d'exposition aux lamelles (phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) pour le contrôle positif de l'activation macrophagique et cellules seules pour le contrôle négatif), les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis centrifugées. Les culots cellulaires sont ressuspendus dans du TRIzol® et l'ARN est extrait avec du chloroforme et de l'éthanol. Leur qualité est analysée *via* un Bioanalyser 2100 (Agilent®) pour s'assurer de leur non dégradation. Puis, un microgramme d'ARN est rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une rétro-transcriptase (M-MLV reverse transcriptase – EC 2.7.7.4.49, Invitrogen) selon le protocole du kit fabriquant. Enfin, une qRT-PCR (*quantitative Retro Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) en temps réel est réalisée (Stratagene Mx3000p - Agilent). Pour cela, 100 ng d'ADNc sont placés avec 10 µM d'amorces correspondant aux gènes testés (Table 3). La méthode d'amplification comprend 40 cycles durant lesquels la quantité d'ADNc est mesurée par détection d'une sonde fluorescente liée aux nucléotides (SYBR Green) à 520 nm dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADNc amplifiée.

Table 3 : Séquences des amorces de gènes utilisées pour la qRT-PCR

Gène	Amorces Sens	Amorces Anti-sens
ncf-1	5'-TTCACAACTACGCAGGTGAA-3'	5'-TTATCTCCTCCCCAGCCTTC-3'
il-1β	5'-TGAAGTGCTCCTTCCAGGAC-3'	5'-TCGTTATCCCATGTGTCGAA-3'

Par la suite, le niveau d'expression de chaque gène est calculé par la méthode du ΔΔCt par rapport au gène rapporteur beta-2-microglobuline (*b2m*) selon la formule :

$$Niveau\ d'expression = 2^{\Delta Ct_{étudiés} - \Delta Ct_{Rapporteur}}.$$

Où Ct correspond au nombre de cycle où la quantité d'ADNc dépasse une quantité seuil préalablement choisie. Pour chaque condition, les valeurs de Ct du gène étudié sont comparées avec les valeurs du contrôle positif (PMA) pour ce même gène. Le calcul du niveau d'expression de ce gène se fait ensuite par comparaison avec le gène « contrôle ».

3.5.4. Interaction avec le sang

Le pourcentage d'hémolyse induit par des lamelles recouvertes par les films a été mesuré. Pour cela, les lamelles ont été incubées pendant 1 h dans 10 mL de NaCl 0,9 % stérile (B-Braun) dans des flacons à 37 ± 2 °C sous agitation douce (50 r.p.m.).

Du sang artériel total d'un rat Wistar préalablement traité par de l'héparinate de sodium a été collecté dans un tube contenant de l'EDTA disodique puis dilué (2 mL de sang dans 2,5 mL de NaCl 0,9 %). Tout de suite, 200 µL de sang dilué sont ajoutés dans les flacons. Les lamelles sont incubées pendant 1 h dans les mêmes conditions que précédemment. Enfin les solutions sont centrifugées à 1000 × g pendant 5 min puis l'absorbance du surnageant a été mesurée à 576 nm (pic d'absorbance de l'hémoglobine). Le pourcentage d'hémolyse (HR) a été obtenu par la formule :

$$HR = 100 \times \frac{(AS - AN)}{(AP - AN)}$$

Où AS est l'absorbance du surnageant de l'échantillon, AP et AN représentent l'absorbance des contrôles positifs d'hémolyse (10 mL d'eau pure + 200 µL de sang dilué) et négatifs (10 mL NaCl 0.9 % + 200 µL de sang dilué) respectivement.

4. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les différentes comparaisons statistiques ont été réalisées par une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey-Kramer. Ces tests ont été utilisés en se basant sur l'hypothèse d'une distribution Gaussienne des valeurs en ce qui concerne l'ANOVA et afin de pouvoir comparer plusieurs groupes entre eux. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel RLplot 1.5® avec un seuil de significativité défini pour $p < 0,05$.

VII RESULTATS

1. Préparation et caractérisation des films

Le dépôt des films sur les lamelles de verre peut être visualisé (Figure 17A) par l'apparition d'une coloration rose à leur surface. Cette coloration est due à la bande plasmon de résonnance (pic maximal d'absorbance) caractéristique des AuNP en suspension. Lorsqu'une nanoparticule métallique est soumise à un champ électromagnétique dont la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules (400 à 800 nm *vs*. 5 nm, respectivement), certains électrons des atomes d'or de la nanoparticule oscillent collectivement et en phase. La bande plasmon se caractérise comme un phénomène de résonance des électrons des atomes d'or, ce qui entraine une absorbance à une longueur d'onde spécifique.

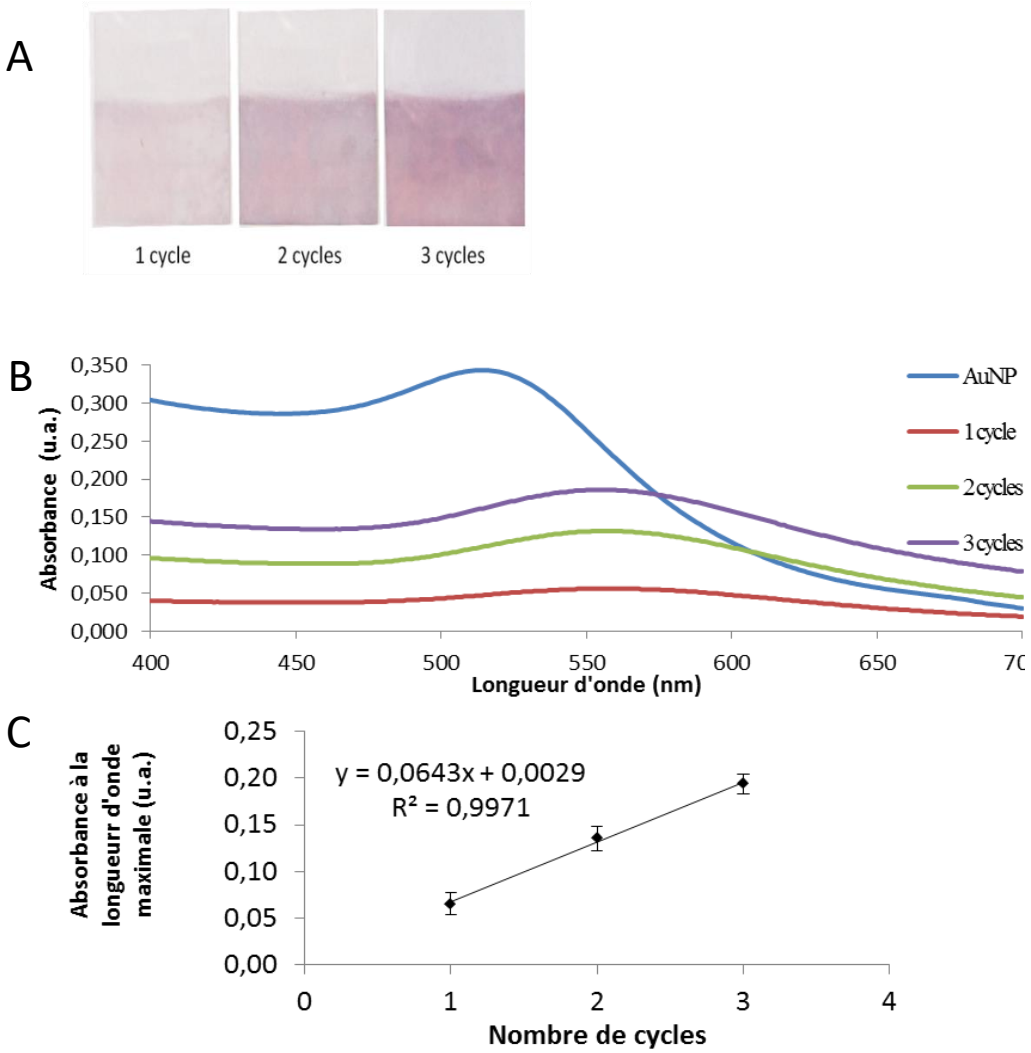


Figure 17 : (A) Aspect des lames en fonction du nombre de cycles de nanoparticules d'or déposés, (B) Spectre visible d'AuNP en suspension et de films composés d'1 à 3 cycles, (C) Absorbance à la longueur d'onde maximale des films en fonction du nombre de cycles déposés, n = 3.

1.1. Caractérisation physico-chimique

La bande plasmon, située à 509 ± 1 nm pour les AuNP en suspension est aussi mesurée pour les films (Figure 17B). Dès le dépôt de la première couche, on peut observer un phénomène appelé « red shift », ceci signifie que la bande plasmon subit un déplacement vers des longueurs d'ondes plus importantes (544 ± 1 nm).

De plus, l'ajout successif de couches à la surface des échantillons s'accompagne d'une augmentation linéaire de l'absorbance à la longueur d'onde maximale (Figure 17C), ce qui signifie que la quantité d'AuNP déposée à la surface du film est proportionnelle au nombre de cycle, prouvant donc bien la répétabilité de la méthode. De plus les faibles écart-types retrouvés à chaque mesure de l'absorbance des lames montrent bien la reproductibilité de cette méthode.

Afin de prouver la présence de nanoparticules d'or individualisées au sein des films, des images en MET ont été réalisées à la fois sur les AuNP en suspension ainsi que sur des films multicouches déposés directement à la surface des grilles de MET (Figure 18). Ces clichés mettent bien en évidence le caractère individualisé des AuNP. Cela a aussi permis de caractériser leur taille : 5,3 ± 1,1 nm pour les AuNP en suspension ce qui concorde avec les données du laboratoire (113), 5,3 ± 1,2 nm pour les AuNP piégées dans le film composé d'un seul cycle et 5,2 ± 0,9 nm dans le cas du film composé de trois cycles. Ces mesures, corrélées aux clichés de MET confirment bien la présence d'AuNP sans modification significative de taille ou de phénomène d'agrégation au sein des films multicouches.

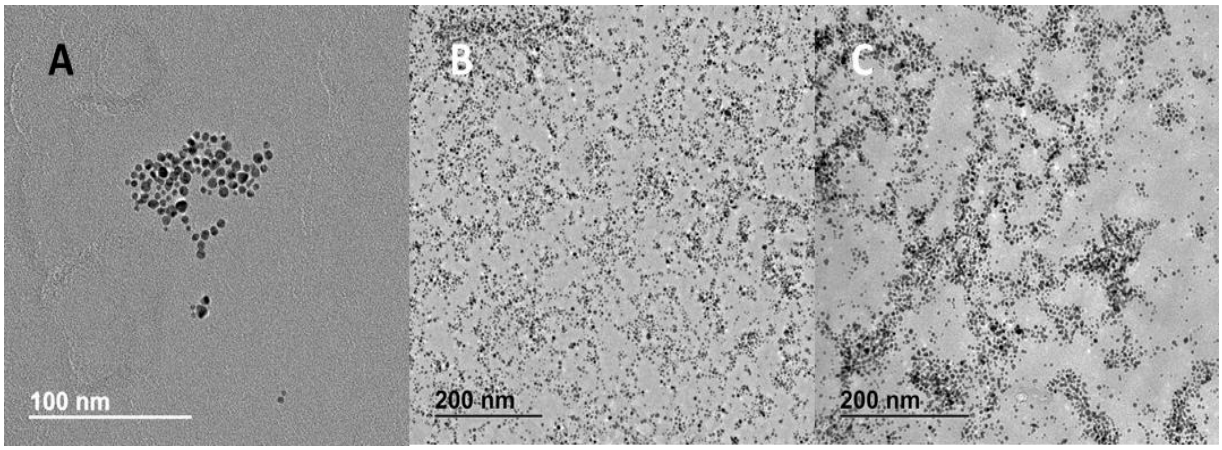


Figure 18 : Images en MET (A) des AuNP en suspension, (B) d'un film composé d'un cycle (C) et de trois cycles.

Concernant la quantification de l'or, les films composés de 3 cycles présentent une quantité d'or correspondante à $8,2 \pm 0,3 \times 10^{11}$ NP/cm². On ne peut quantifier la quantité d'or présente dans les films qu'à partir de 3 couches (1 et 2 couches inférieures à la limite de quantification) mais ceci a permis de prouver la présence d'or.

Pour avoir une idée de la topographie de surface formée par les films, des observations en AFM ont été réalisées. Premièrement, les films à base d'AuNP (20 cycles) observés à sec montrent une augmentation de la rugosité par rapport à des films sans nano-objets (20 cycles) (Figure 19A). Deuxièmement, des observations ont été réalisées sur des films immergés dans du PBS dont la dernière couche variait : soit $[PAH/AuNP/PAA]_2$-PAH/AuNP lorsque le film se terminait par une couche d'AuNP, soit $[PAH/AuNP/PAA]_3$ lorsqu'il se terminait par une couche de PAA, soit $[PAH/AuNP/PAA]_3$-PAH avec une couche externe en PAH (Figure 19B) et notés respectivement *AuNP*, *PAA* ou *PAH*. Les résultats montrent que la topographie générale des films change peu lorsque le PAH ou le PAA se situent sur la couche la plus externe.

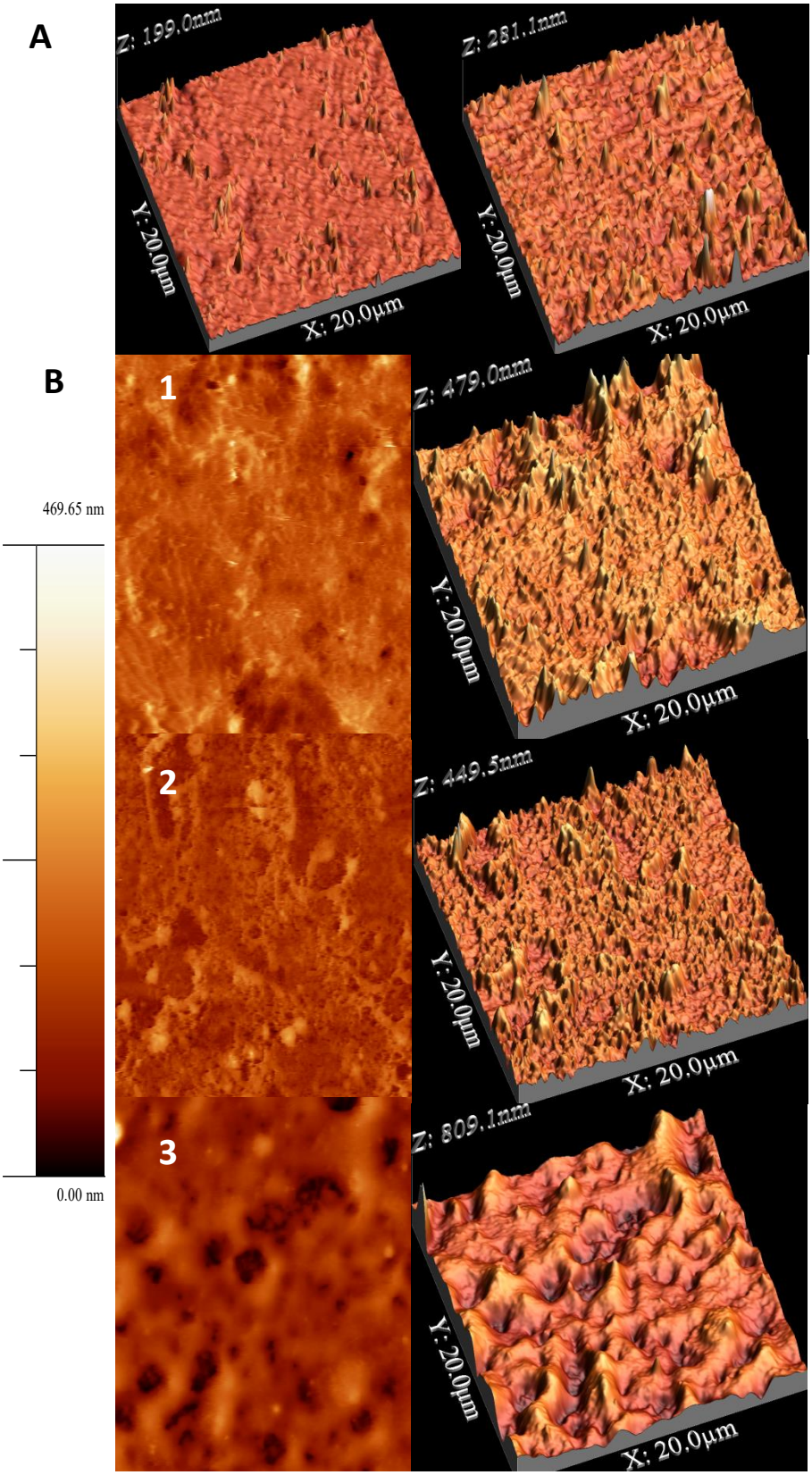


Figure 19 : Images réalisées en AFM. (A) Vision en 3 dimensions de films composés de 20 couches de polymères (gauche) sans AuNP et (droite) avec AuNP. (B) en fonction de la couche la plus externe (gauche vision en 2 dimensions et droite vision en 3 dimensions) (1) *PAH*, (2) *PAA*, (3) *AuNP*

Mais dans le cas où les AuNP sont sur la dernière couche un relief plus marqué apparait à la surface du film. De plus, des observations à des grossissements plus importants n'ont pas montré d'AuNP en surface. Ces mesures ont aussi permis de déterminer l'épaisseur moyenne des films qui est de 284 nm pour les films se terminant en *PAH*, 244 nm pour les films en *PAA* et 275 nm pour les films en *AuNP*, avec une rugosité de 39, 31 et 65 nm respectivement. Ces résultats montrent une épaisseur de film relativement constante quel que soit le film testé et la nature de la dernière couche n'a que peu d'influence sur l'épaisseur totale du film. Cependant les mesures de rugosité montrent une différence relativement importante entre les films *PAH* ou *PAA* (39 et 31 nm respectivement) et les *AuNP* (65 nm). Cette augmentation de rugosité peut apporter une première indication laissant à penser que les AuNP pourraient s'enfoncer à l'intérieur du film du fait d'une densité supérieure comparée à celle des chaînes de polymères.

Puis, l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), qui est un outil de séparation puissant (les espèces chargées ou neutres migrent dans un capillaire de silice sous l'effet d'un champ électrique) a été utilisée pour évaluer la modification de charges de surface de trois différents films : $[PAH/AuNP/PAA]_3$-PAH ; $[PAH/AuNP/PAA]_3$ et $[PAH/AuNP/PAA]_2$-PAH/AuNP. En ECZ, la mobilité apparente dépend à la fois du ratio charge/masse de l'analyte mais aussi du flux electro-osmotique (FEO) résultant des charges de surface des parois du capillaire (négative due à la présence de groupement silanols ionisés). Pour un analyte neutre, le temps de migration observé dépend uniquement du FEO et est donc directement lié à la charge de surface du capillaire (à la fois en signe et en intensité). Comme exemple, un électrophorégramme typique est décrit en figure 20. Le temps de migration du marqueur de neutre (TMN) a été enregistré en fonction de la dernière couche déposée à la surface du capillaire. Après une couche de PAH (couche 1) le TMN augmente drastiquement (de 5 à 24 min) dû aux charges positives du polycation qui interagissent avec la silice nue, entrainant une neutralisation du FEO. Puis la couche d'AuNP induit une légère diminution dans le TMN ($2^{ème}$ couche : TMN = 16 min) dû au dépôt de charges négatives. Enfin, la couche de PAA permet un retour du TMN proche de celui de la silice nue ($3^{ème}$ couche : TMN = 9 min) ce qui indique une importante charge anionique de surface.

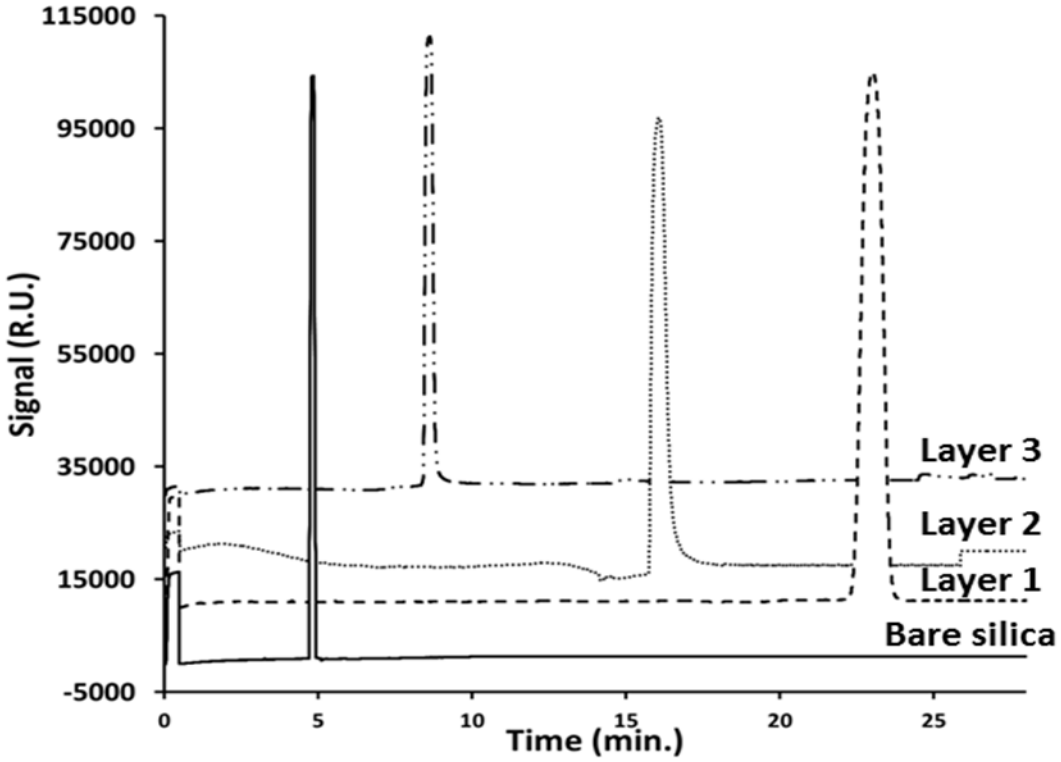


Figure 20 : Electrophorégramme de l'alcool benzylique en fonction de l'état de surface du capillaire. Layer 1 correspond à une couche de PAH, layer 2 [PAH-AuNP] et layer 3 [PAH-AuNP-PAA]

Le premier cycle [PAH/AuNP/PAA] a ensuite été répété deux fois et les FEO obtenus pour chaque couche sont décrits en figure 21. Des résultats similaires ont été mesurés pour chaque cycle, ce qui montre le rôle prédominant de la dernière couche déposée sur les caractéristiques du film. Ceci montre bien que les films $[PAH/AuNP/PAA]_3$-PAH ; $[PAH/AuNP/PAA]_3$ et $[PAH/AuNP/PAA]_2$-PAH/AuNP qui ne diffèrent que par leur dernière couche sont différents à la fois en terme de rugosité et de charge surface, ce qui peut impacter grandement leurs interactions avec du matériel biologique.

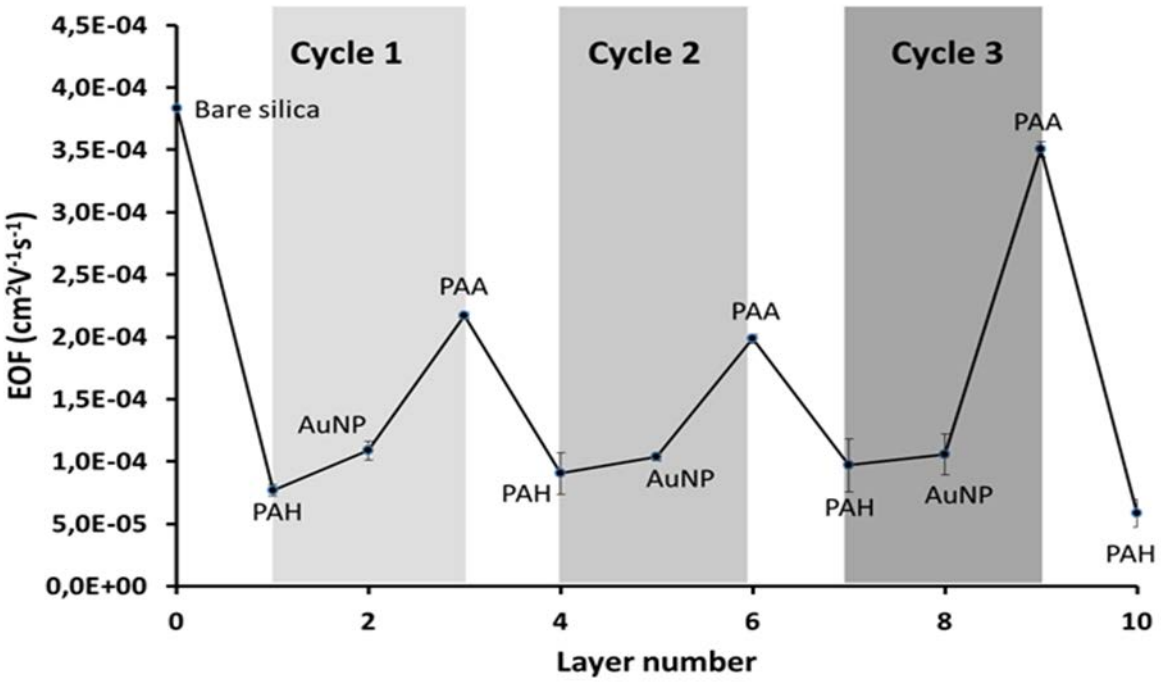


Figure 21 : Evolution du FEO au sein d'un capillaire en fonction du nombre de cycles déposés. Le nom de chaque point correspond à la dernière couche déposée.

1.2. Stabilité des films

Les films ont montré une stabilité importante non seulement au cours du temps, que ce soit à 4 ± 4 °C à sec ou dans du PBS à 37 ± 1 °C. En effet, ils présentent une stabilité sur une période supérieure à 1 an (suivi de l'absorbance de la bande plasmon : $A_{t=0}$ = 0,217 ± 0,018 et $A_{t=10\ mois}$ = 0,228 ± 0,012 pour les lames à 4 °C et $A_{t=0}$ = 0,220 ± 0,012 et $A_{t=10\ mois}$ = 0,226 ± 0,019 pour les lames à 37 °C). Ceci tendrait à montrer l'absence de relargage d'AuNP dans la solution à partir des films. Au contraire, les AuNP en suspension présentent une stabilité d'environ un mois dans leur milieu de synthèse (contenant 5,4 × 10^{-2} M de citrate de sodium) et inférieure à 1 h lorsqu'elles sont diluées dans du PBS quelle que soit la température d'incubation. De plus, quelle que soit la condition dégradante testée, aucune modification spectrale significative n'est observée sur les films (longueur d'onde maximale (548 ± 3 nm, 546 ± 2 nm et 546 ± 3 nm, pour les pH acides, basiques et en présence de 2 M de NaCl respectivement *vs.* 544 ± 1 nm sans traitement).

2. Comportement biologique des films

En raison de l'activité catalytique résiduelle de leur cœur or, les AuNP en suspension, choisies ici, sont connues pour interagir selon différentes voies (112) : redox (activité réductrice) et/ou liaisons aux groupements thiols (par exemple le glutathion réduit) par des liaisons covalentes mais également *via* des interactions non spécifiques de faible énergie (par exemple avec les protéines).

2.1. Profil antioxydant

Les résultats montrent que quelle que soit la couche la plus externe *PAH*, *PAA* ou les *AuNP*, aucun film ne montre une interaction avec les deux espèces testées : espèce radicalaire ($ABTS^{\bullet+}$) et glutathion réduit (Figure 22).

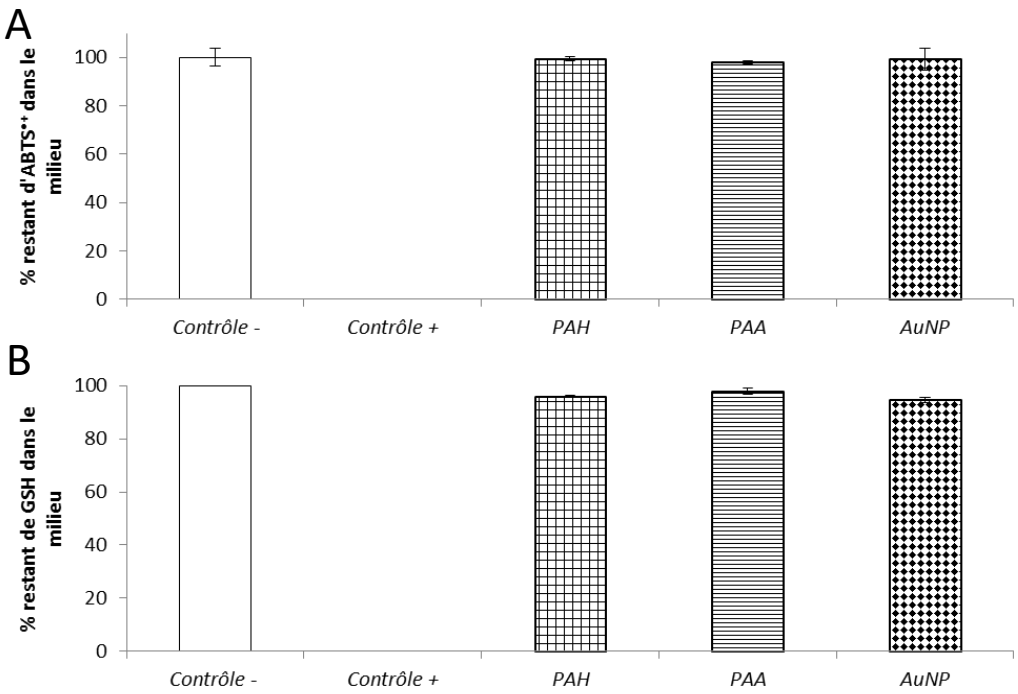


Figure 22 : Interaction entre les films dont la dernière couche varie et (A) le radical $ABTS^{\bullet+}$ dont la décoloration est suivie par spectrophotométrie à 734 nm ou (B) le GSH dont la concentration est mesurée par la réaction d'Ellman à 412 nm, n = 3.

2.2. Adsorption de protéines

Les lamelles recouvertes par les films multicouches ont été incubées en présence d'albumine et de fibrinogène pour mesurer l'adsorption à leur surface (Figure 23). Les expérimentations n'ont pas mis en évidence d'adsorption significative de protéines à la surface des films ce qui est très encourageant quant à la capacité de ces films à être placés en milieu biologique. Il faut cependant prendre en compte le fait qu'il peut exister une quantité résiduelle de protéines déposées à la surface des films qui peut ne pas être mise en évidence car elle est inférieure à la limite de détection des méthodes utilisées (5 µg/mL pour les deux).

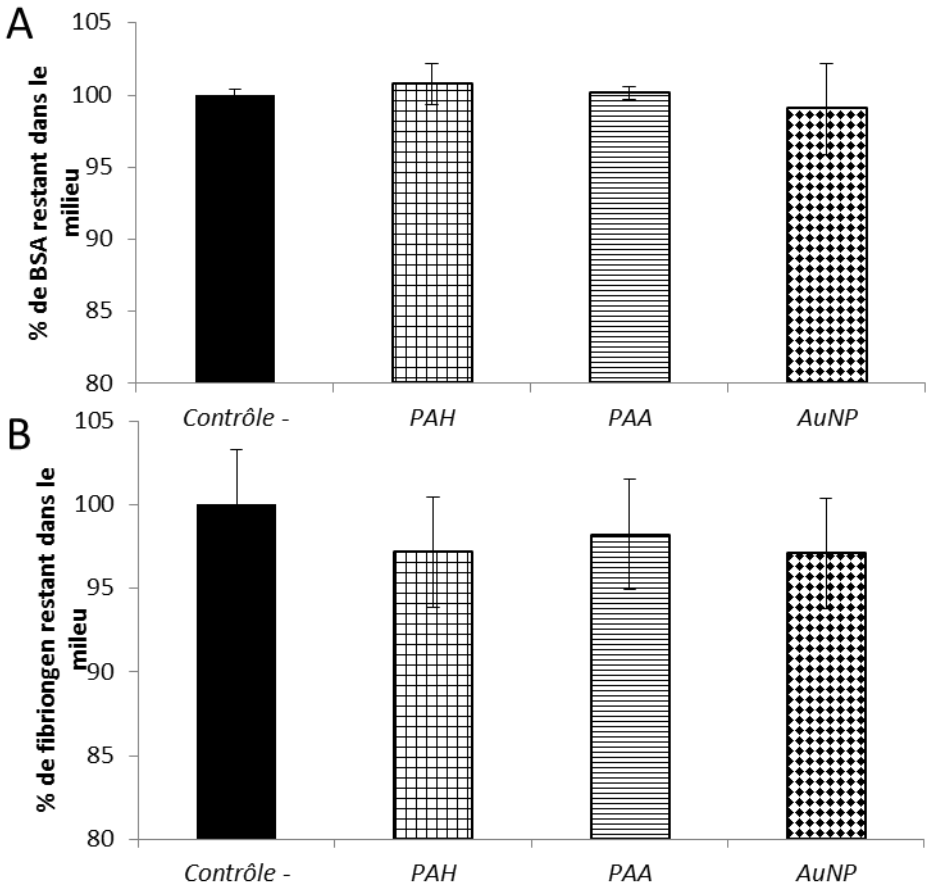


Figure 23 : Adsorption (A) du fibrinogène (2 g/L) suivie par la réaction au BCA et (B) de la BSA (40 g/L) suivie par spectrofluorimétrie, à la surface des films, n = 3.

2.3. Interaction avec des monocytes humains

Les résultats de l'activation des monocytes placés au contact des films déposés sur des lamelles, ne montrent aucune augmentation significative de la quantité d'ARN produit que ce soit pour *ncf*-1 ou *il*-1β. Ceci permet de mettre en évidence une absence d'activation de la voie de l'inflammation ou de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 24).

D'autres voies d'activation devront être explorées avant d'affirmer une absence d'activation des monocytes.

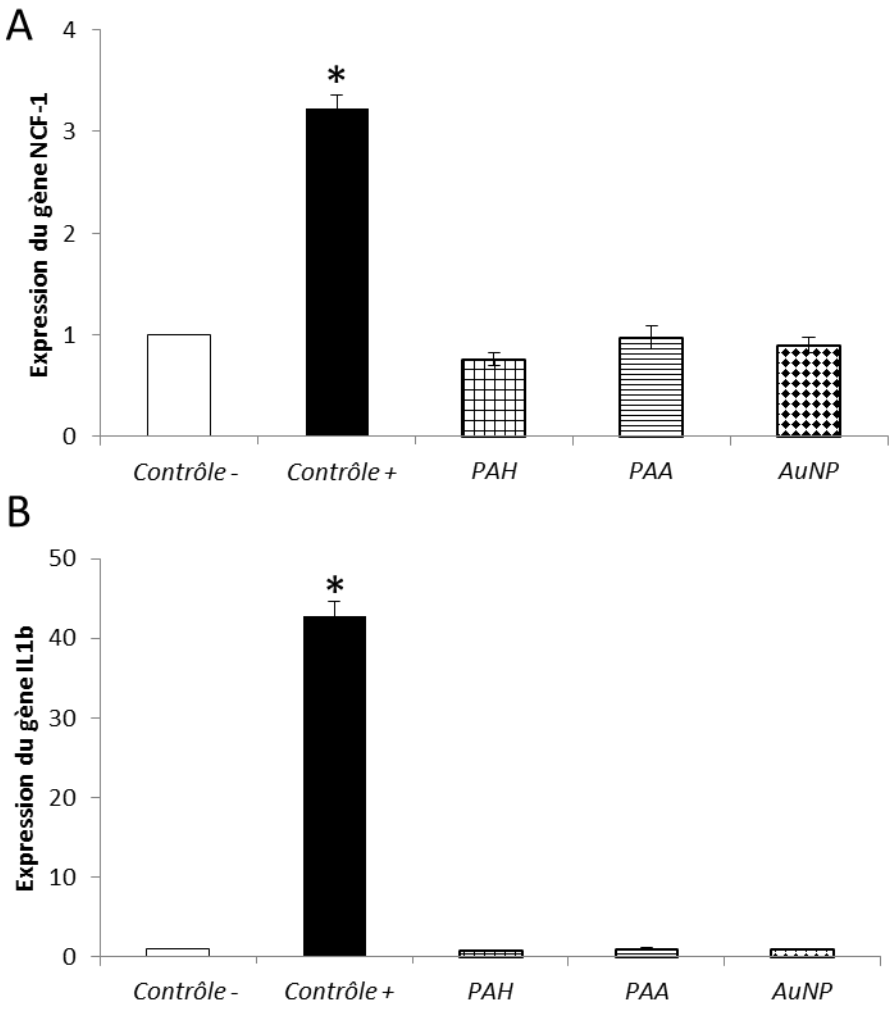


Figure 24 : Mesure de la quantité d'ARN pour (A) *ncf*-1 et (B) *il*-1β présente dans les monocytes humains (lignée THP-1-ATCC®-PIB-202™), n = 3 * $p < 0{,}0001$ *vs* contrôle - .

2.4. Interaction avec du plasma

Du plasma de rat a été injecté en ECZ dans des capillaires recouverts par des films. Après rinçage le TMN est mesuré en fonction de la dernière couche déposée (PAH, AuNP ou PAA) (Figure 25). Lorsque le plasma est appliqué sur un capillaire nu, une adsorption protéique entrainant une neutralisation du capillaire est observée, ce qui entraine une modification du TMN (5 min *vs* 10 min entre les figures 20 et 25 A) caractérisé par une diminution du FEO. Après le dépôt de couches PAH et PAH/AuNP (Figure 25 B), les résultats montrent respectivement une neutralisation de surface importante (aucun FEO en

polarité normale et inversée) ainsi qu'une absence de stabilité des films (multitude de pics détectés) ce qui pourrait poser problème en termes de biocompatibilité. En revanche, lorsque PAA est présent en tant que dernière couche, un unique pic de marqueur de neutre est présent, montrant une stabilisation des couches précédentes (PAH/AuNP) (Figure 25 A). Néanmoins, les films PAH/AuNP/PAA montrent une adsorption protéique plus importante que PAH/PAA (TMN de respectivement 15 min *vs* 6 min).

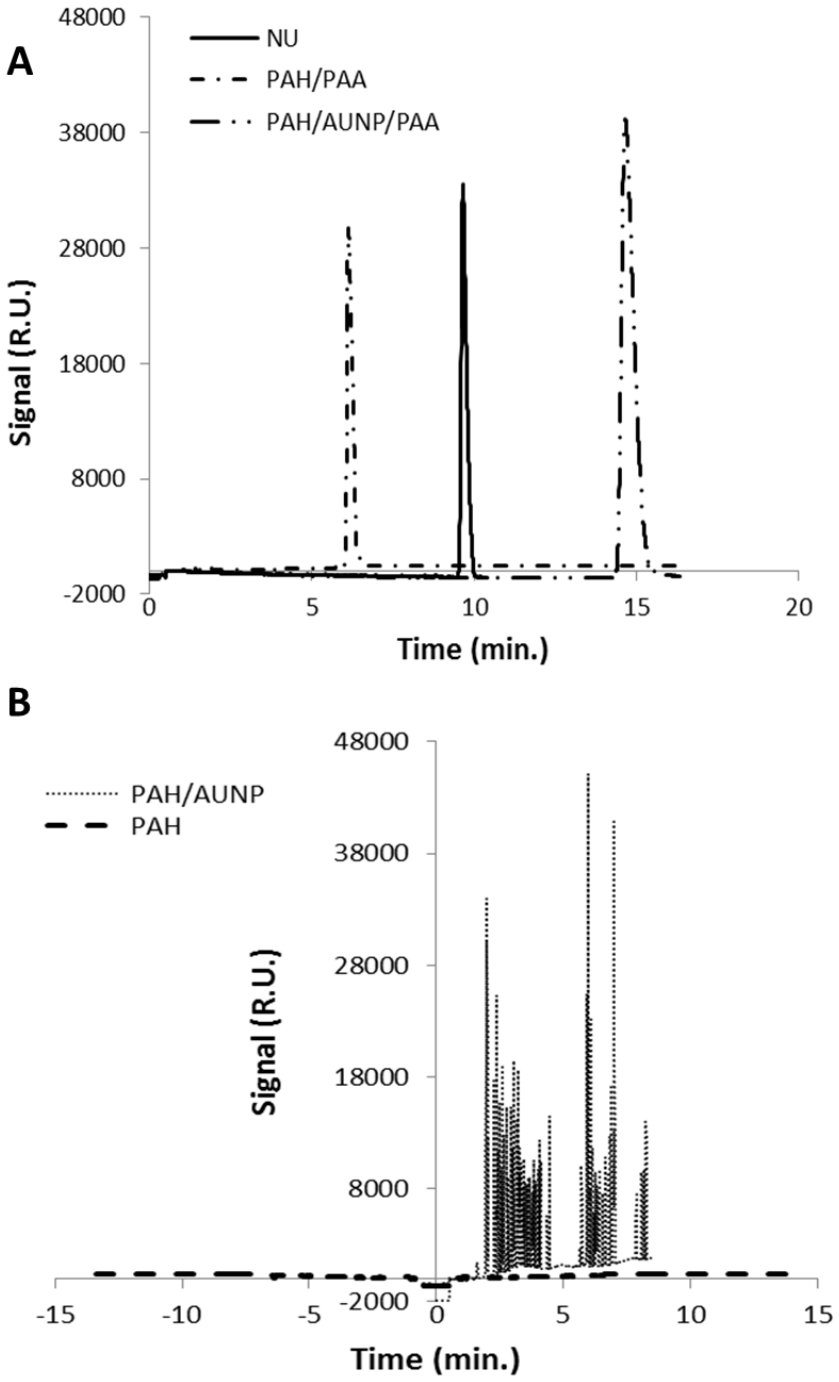


Figure 25 : Electrophorégrammes du temps de migration de l'alcool benzylique après injection de plasma de rat dilué.

2.5. Interaction avec le sang

Afin de vérifier l'hémocompatibilité des films multicouches, le pourcentage d'hémolyse induit après incubation de sang total de rat dilué avec des lamelles recouvertes a été mesuré. Les résultats (Figure 26) montrent une hémolyse significative induite par les films *PAH* ou *AuNP* (respectivement 15,5 ± 4,8 % et 17,6 ± 7,0 %). Au contraire, les films dont la couche externe se compose de PAA n'entrainent pas d'hémolyse (1,2 ± 0,1 %, valeur non significative par rapport au contrôle négatif). Ceci montre que la dernière couche constituant le film a une importance pour la compatibilité biologique du matériau.

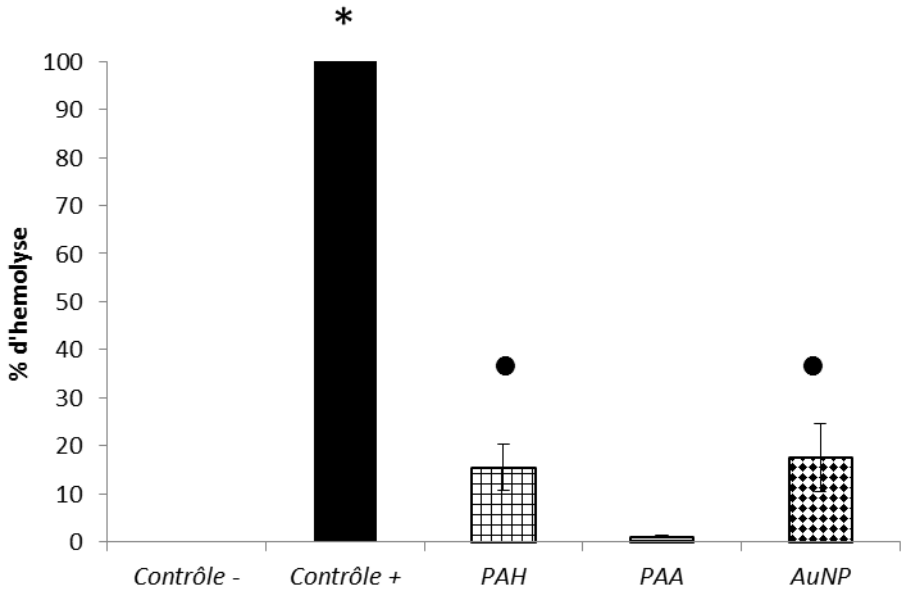


Figure 26: Pourcentage d'hémolyse obtenu après incubation des films multicouches dans du sang de rat dilué.
n = 9 ;* $p < 0{,}0001$ *vs* contrôle - ; ● $p < 0.0002$ *vs* contrôle -.

3. Stents

Les films ont aussi été déposés à la surface des stents selon la même méthode que pour les lames et lamelles de verre. Vingt cycles ont été réalisés sur chaque stent et des observations en MEB et en AFM (Figure 27) ainsi que le dosage de l'or déposé ont été réalisés Le dosage d'or montre un nombre d'AuNP égal à 4,6 ± 3,1 × 10^{12} NP/cm² (n = 3). Ce nombre est cohérent avec le résultat trouvé sur les films composés de 3 cycles et déposés sur les lamelles (moyenne à 8,1 × 10^{11} NP/cm² pour 3 cycles soit une estimation à environ 5,4 × 10^{12} NP/cm² pour 20 cycles). La méthode utilisée pour le dépôt des films est donc bien

reproductible et répétable sur différentes surfaces. L'épaisseur des films est de 296 ± 49 nm pour une rugosité de 65 ± 21 nm (n = 3).

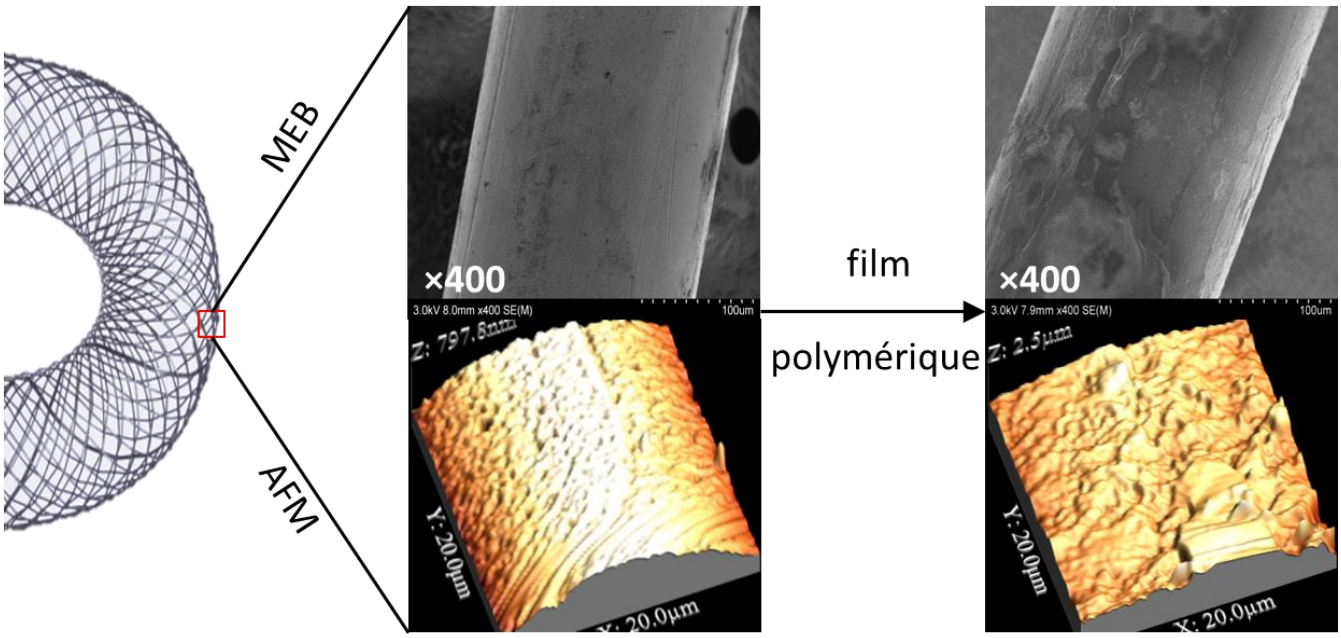


Figure 27 : Observations réalisées en MEB et AFM d'un stent nu et puis d'un stent recouvert de 20 couches de polymères et AuNP.

Les mesures ont été réalisées à sec dans le cas des stents ce qui explique la faible différence d'épaisseur avec les films déposés sur des lames. Les observations sur ces derniers avaient été réalisées dans du PBS ce qui peut induire un gonflement du film sous l'effet de l'écrantage des charges par les ions en solution. Dans notre étude, en raison des quantités très importantes d'AuNP incorporées dans les films ($4{,}6 \pm 3{,}1 \times 10^{12}$ AuNP/cm^2 pour 20 couches déposées sur les stents) ainsi que la possibilité pour chaque particule à être fonctionnalisée avec de forts rendements, elles pourront par la suite constituer un véritable réservoir délivrant NO.

VIII DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude, des films multicouches de polyélectrolytes piégeant des AuNP ont été développés à partir d'un système tripartite (PAH/AuNP/PAA). Ces films, stables dans le temps ainsi que dans des conditions dégradantes, n'ont pas montré de réactivité vis-à-vis de différentes molécules (un composé radicalaire et un thiol) et de deux protéines physiologiques. Leur comportement après incubation en présence de cellules (monocytes et sang total) a montré une compatibilité biologique satisfaisante notamment lorsque le polyanion est utilisé pour la couche la plus externe.

Classiquement, dans la littérature, les films nanostructurés sont constitués par deux partenaires : un polyélectrolyte et des nanoparticules caractérisées par une charge opposée (116). Dans notre étude, un système à trois partenaires a été étudié, constitué par un polycation, des AuNP et un polyanion. En effet, alors que les AuNP sont chargées négativement, l'ajout d'un polyanion pourrait sembler superflu ; cependant, ce composé peut augmenter la compatibilité des films créés en comblant certains espaces couverts seulement par le polycation et non remplis par des nanoparticules. L'ensemble crée alors une surface homogène globalement chargée négativement qui est mieux tolérée par les constituants biologiques. Ce point constitue un point original par rapport à la littérature.

Les films ont été préparés en utilisant des polyélectrolytes mis en solution à pH 7,4 avec une concentration en sel isotonique au plasma. Cela favorise, d'une part, un pourcentage d'ionisation maximal (par le choix de polyélectrolytes ayant des valeurs de constante d'ionisation, pKa, adéquates) et d'autre part un déploiement optimal des chaînes de polymères de manière à créer un véritable réseau interconnecté d'interactions électrostatiques (107, 117). Dans ces conditions et *via* l'utilisation d'un protocole classique de trempage (107), ces films ont été formés et ont présenté une bonne répétabilité et reproductibilité. En effet, grâce aux propriétés spectrales des AuNP, le suivi de la valeur de la bande plasmon de résonnance ainsi que la valeur de l'absorbance à cette longueur d'onde constitue un contrôle qualité dans leur réalisation.

Cette étude a mis en évidence des différences de comportement entre les AuNP en solution (sous forme colloïdale) et celles piégées dans les couches de polymères (créant la nanostructuration du matériau). En effet, de nombreuses études, dont certaines réalisées au sein du laboratoire, ont montré une réactivité de ce type d'AuNP (112, 113). Elles sont relativement stables dans leur milieu de synthèse (tampon citrate de sodium) mais très peu stables une fois diluées dans d'autres solutions (comme par exemple dans le PBS). En effet, ces particules sont stabilisées en surface par des ions citrate *via* des liaisons de faible énergie

de type Van der Waals et liaison hydrogène (118). Lors d'une dilution, ces interactions sont fragilisées et se rompent ce qui conduit les particules à s'agréger. Ceci est visualisé par une augmentation de la valeur de la bande plasmon de résonnance et une diminution de l'absorbance des AuNP à cette valeur. De plus, la surface des AuNP est caractérisée par une réactivité relativement importante en raison de délocalisations électroniques existant d'un atome d'or à l'autre. Ainsi qu'il est classiquement décrit dans la littérature et vérifié dans de précédents travaux au sein du laboratoire, cela entraine des réactions vis-à-vis d'espèces radicalaires (réduction de l'$ABTS^{\bullet+}$), de thiols (création de liaisons covalentes or-soufre) et des protéines (des adsorptions *via* des interactions non spécifiques) (112, 113). Cette étude a mis en évidence un confinement des AuNP au sein des couches de polymères, les rendant moins réactives. En effet, une bonne stabilité a été observée dans différentes conditions : à sec et à 4 °C, à 37 °C incubées dans du PBS, et vis-à-vis de radicaux, thiols, protéines, cellules et sang total. Cette partie est importante pour un futur développement en tant que couverture d'un dispositif médical même si l'absence de relargage de particules devra encore être directement vérifiée par des dosages d'or (à faire par l'utilisation de la spectrométrie par torche à plasma couplée à une détection en spectrométrie de masse (ICP-MS) ou par une technique de chromatographie liquide haute performance couplée à une détection spectrofluorimétrique détectant la paire d'ions Au-Rhodamine) dans les différents milieux d'incubation. Cette réactivité très amoindrie a été aussi notée vis-à-vis des molécules et protéines testées. Ceci peut être expliqué par le fait d'avoir structuré le film multicouche par des interactions électrostatiques intimement interconnectées. En effet, des observations en AFM sembleraient montrer une inclusion forte des AuNP au sein des couches de polymère ce qui donnerait une explication au résultat obtenu dans après incubation avec le sang. Le même pourcentage d'hémolyse est obtenu avec la condition *PAH* ou *AuNP*. Si les AuNP sont intimement incluses dans les couches de PAH, il semble logique d'avoir le même résultat. Ceci pourrait être expliqué par deux éléments : la densité importante des nano-objets (l'or a une densité de 19,3 kg/L) en comparaison d'un film ayant une capacité de gonflement dans des milieux aqueux (du fait du choix des polyélectrolytes) (118) et également par le fait que cette inclusion permette aux AuNP fortement chargées négativement d'interagir d'autant mieux avec les charges positives du polycation. Cet élément peut expliquer pourquoi les AuNP piégées dans les films multicouches sont caractérisées par une réactivité amoindrie.

Le film polymérique intégrant des nanoparticules d'or est représenté comme un empilement successif des différentes couches. Dans cette représentation, on considère que les

couches ainsi déposées restent statiques et sans réelle interaction les unes avec les autres. Or la différence entre les polymères et les nanoparticules utilisés pour la formation des couches est énorme, tant en termes de charge, de densité, … Cette vision d'un montage en « *sandwich* » est donc potentiellement erronée. Cette hypothèse est confortée par plusieurs points, l'observation en AFM d'un film avec une couche externe de nanoparticules n'a pas mis en évidence la présence en surface de ces dernières. Au contraire la surface présentait une rugosité bien plus importante ce qui laisse à penser que les nanoparticules, du fait de leur densité bien plus importante par rapport au polymère, sont capable de s'intégrer à l'intérieur du film. De plus, les dernières études réalisées au laboratoire ont montré qu'un film formé de trois cycles pouvant continuer à absorber un nombre important de nanoparticule d'or. Ce résultat a été observé en ECZ, spectrophotométrie UV-Vis, mais aussi grâce à l'utilisation d'une microbalance à quartz capable de détecter des dépôts de l'ordre du ng/cm². Cette surcharge en nanoparticule peut s'avérer d'une grande utilité surtout dans l'optique d'augmenter une charge utile en principe actif du dispositif médical. Cependant ce phénomène pourrait entrainer une modification de comportement du matériau en termes de biocompatibilité. En effet, si les nanoparticules venaient à être apparentes en surface, la réactivité aux protéines, éléments du sang, cellules … en serait modifiée et le dispositif pourrait entrainer des effets secondaires indésirables. Cette surcharge peut aussi modifier les propriétés physiques du revêtement, entrainant une fragilisation par exemple. Un film fragilisé libérerait donc à plus court terme et de façon plus massive les nanoparticules. Dans le cas des stents envisagés ici, le relargage se ferait directement dans la circulation sanguine. La question de la toxicité des nanoparticules d'or ainsi que de particules constituées d'AuNP et / ou de polymères créées lors de cette désagrégation se posera alors. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus au sein de la communauté scientifique quant à la toxicité des nanoparticules d'or. En fonction de leur taille (< 5-6 nm) elles pourraient être éliminées par le système urinaire (119). Cependant, en raison de leur réactivité de surface, elles peuvent être recouvertes de protéines puis phagocytées par des cellules immunocompétentes. Au sein du cytosol, la particule aura du mal à être éliminée par les systèmes enzymatiques existants (119). Il parait donc évident qu'un relargage non contrôlé et massif de nanoparticules dans l'organisme est à éviter.

Les films créés sont destinés au traitement d'une maladie cardio-vasculaire ischémique : la resténose apparaissant suite à la mise en place d'un stent. En effet, à terme, les AuNP seront fonctionnalisées par des RSNO afin de constituer un réservoir conséquent de

principe actif (NO) ; le nombre de couches déposées contrôlera le profil de libération. Différents résultats obtenus dans cette étude préliminaire sur des films modèles chargés en AuNP non fonctionnalisées vont dans le sens de cette future application. Ainsi, deux protéines ont été testées pour vérifier leur affinité d'adsorption à la surface des films multicouches : l'albumine, la protéine la plus abondante dans le plasma humain, connue pour avoir une forte capacité à couvrir les AuNP (120, 121) et le fibrinogène, une protéine essentielle dans la cascade de la coagulation. Ces deux protéines n'ont pas présenté d'adsorption à la surface des films. De plus, les films présentent une cytocompatibilité vis-à-vis des monocytes sanguins (absence de toxicité et d'activation) et des globules rouges (absence d'hémolyse) en prenant en compte uniquement les films multicouches dont la dernière couche est du PAA.

Certaines de ces expériences seront donc à conforter. Les résultats ont été obtenus dans un système statique sans flux circulatoire or, la contrainte de cisaillement exercée sur le matériau lors du passage du sang peut déstabiliser le film. Il sera donc nécessaire de tester la stabilité des films en contrôlant l'absence d'or libéré dans le flux (sous forme ionique et sous forme nanoparticulaire). En parallèle, l'adsorption protéique devra être à nouveau vérifiée en condition dynamique. Enfin, un phénotypage plus complet de cellules immunocompétentes devra être réalisée. Seule une étude de l'expression des ARN a été menée montrant une bonne cytotolérance de nos systèmes. L'absence de l'initiation d'une réponse immunitaire par l'activation de cellules présentatrices de l'antigène (lymphocytes B, cellules dendritiques et macrophages) et l'expression de différentes protéines (complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 ou de classe 2, sécrétion d'interleukines et autres marqueurs de l'inflammation…) devra être contrôlée.

Enfin, des premiers résultats ont montré que cette couverture nanostructurée a été déposée avec succès sur des stents à base de Nitinol®. Néanmoins, le protocole de dépôt devra sans doute être optimisé pour obtenir le meilleur compromis entre un maximum de chargement d'AuNP par couche et la meilleure compatibilité en particulier en modifiant les polyélectrolytes choisis. La nature du polycation est un élément clé qui contrôle l'ancrage des AuNP dans les films. Différentes propriétés physico-chimiques du polycation sont à prendre en compte dans ce choix : constante d'ionisation (pKa), nombre d'unités susceptibles d'être chargées positivement par monomère. Par exemple, la polyéthylèneimine qui présente une valeur de constante d'ionisation de 10,5 (122) est caractérisée par 4 groupements de types amines primaires susceptibles d'être ionisés à pH physiologique : ceci représente une densité

de charge 4 fois supérieure au PAH testé ici. Cependant, d'autres facteurs sont aussi à prendre en compte pour chaque polyélectrolyte, en plus de ceux mentionnés précédemment, leur masse molaire, le milieu (pH et force ionique) dans lequel ils sont dissous avant de former les films. En effet, ces paramètres ont une importance capitale et vont conditionner la topographie de surface et la rugosité ainsi que les propriétés mécaniques des films. Or ces éléments sont essentiels à la future compatibilité de la couverture nanostructurée (123).

Les résultats obtenus dans cette étude préliminaire sont essentiels et permettent d'apporter une première preuve de concept au projet en termes de faisabilité de la nanostructuration de films multicouches pour une visée biomédicale même *via* l'utilisation de nanoparticules connues pour être plutôt réactives. A terme, les AuNP seront fonctionnalisées par des donneurs de NO, les RSNO, afin de lutter contre la resténose et grâce à ses actions bénéfiques (effet antiagrégant plaquettaire, effet anti-prolifératif sur les CML et effet de recrutement de cellules endothéliales) sur les différents paramètres retrouvés dans cette pathologie (102). De manière générale, les AuNP sont capables d'être fonctionnalisées avec des rendements très intéressants (par exemple jusqu'à 40 peptides par AuNP (124)).

Enfin, la toxicité des nanomatériaux, qui est à l'heure actuelle, encore loin de faire consensus au sein de la communauté scientifique ne sera pas abordée en détail dans ce manuscrit. Nous sommes conscients du débat quant à la potentielle toxicité des AuNP utilisées pour la nanostructuration des dispositifs médicaux en général mais les études réalisées n'ont montré aucun relargage à long terme de ces dernières. Je me suis donc concentré sur l'apport bénéfique des nanotechnologies dans le domaine des DM plutôt que leur effet souvent décrit (à tort ou à raison) comme délétère.

IX CONCLUSION

L'utilisation des nanotechnologies au sein des DM peut être vaste et ouvrir des perspectives intéressantes. Certains sont déjà sur le marché et de nombreux autres sont en phase de développement dans des domaines aussi variés que la chirurgie, l'orthopédie ou encore les spécialités cardiovasculaires. Des améliorations peuvent aussi avoir lieu pour les produits plus communs tels que les textiles médicaux, les produits de soin courants (crèmes solaires), les instruments médicaux dans le but d'une amélioration globale de la santé, de la qualité de vie et du bien-être du patient. Les futurs dispositifs intégrant des nanotechnologies pourraient bouleverser le monde des DM actifs ou des DM-DIV notamment par l'utilisation des nanosondes ou nanodispositifs.

Nous assistons en effet à un glissement voire à un effacement de la frontière entre médicaments et DM grâce à ces avancées technologiques. Cette limite devient de plus en plus ténue avec par exemple l'utilisation de nanoparticules pour le suivi de la glycémie par des dispositifs implantables ou la création de surfaces nanoporeuses faisant office de tubules rénaux. La dualité de fonction d'un médicament à être aussi un DM et vice versa devient aussi de plus en plus problématique avec l'apparition de dispositifs médicaux capable de libérer des principes actifs La classification utilisée jusqu'à présent pourrait ne plus être forcément évidente et requérir un examen approfondi du mode d'action précis de ces nanotechnologies pour redonner de nouvelles définitions. Doit-on toujours parler de DM ou bien de formes galéniques spécifiques d'une pathologie ? De plus les règles de mises sur le marché entre médicaments et DM ne font pas appel aux mêmes textes législatifs (autorisation de mise sur le marché *versus* norme CE), dans cette perspective, lequel devra s'appliquer pour le respect de la sécurité d'utilisation ?

Un autre point à considérer avec l'utilisation des nanotechnologies est le contrôle qualité des matériaux ainsi créés. Le contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique est un point clé lors de la fabrication de médicaments. Avec la frontière de plus en plus étroite entre médicament et DM, il apparait nécessaire de développer voire d'inventer le contrôle qualité des nanomatériaux, au même titre que celui des médicaments et des DM. Le contrôle de la matière première en elle-même est bien évidemment primordiale, mais aussi celui de toutes les nanostructures engendrées pour s'assurer de la répétabilité de la conception et des propriétés du matériau. Pour cela de nombreuses techniques sont disponibles mais jusqu'à présent aucune ne fait consensus dans la littérature. A l'heure actuelle, on ne recense presque pas de travaux sur la mise en place d'un contrôle qualité fiable lors de la fabrication de nanomatériaux (125), qui prendrait en compte non seulement les caractéristiques intrinsèques

du nanomatériau (taille, porosité, épaisseur, rugosité …) mais aussi les éventuelles impuretés provenant de sa synthèse. Dans ce manuscrit, malgré l'absence de consensus, l'analyse de la littérature montre que 8 points clés sont importants à considérer pour caractériser les nanomatériaux : taille et répartition de taille, forme, agrégation/agglomération, surface spécifique, composition (chimique, structurale …), charge et chimie de surface.

Enfin, parmi les quelques perspectives évoquées, beaucoup se trouvent encore à l'état embryonnaire en termes de recherche, le plus souvent même au stade de preuve de concept. Ces prototypes attendent toujours d'être perfectionnés au laboratoire puis lors des essais précliniques et cliniques, avant d'être utilisés en tant que DM réalistes et commercialisables. Les nanotechnologies restent tout de même des outils importants pour le développement futur de la médecine. Elles pourront améliorer les technologies déjà présentes mais aussi créer de nouveaux dispositifs toujours plus intelligents, perfectionnés et biocompatibles. Ainsi, dans la partie expérimentale de ce manuscrit, des films piégeant des nanoparticules ont été étudiés pour proposer une innovation dans le domaine cardiovasculaire d'un DM à visée thérapeutique ou d'un médicament immobilisé sur un matériau. Ce type de films est couramment étudié au sein de la littérature, avec des variations au niveau des polymères, des nanoparticules utilisées … Ces études ont pu montrer une grande adaptabilité des films à beaucoup d'applications. Ceci laisse une grande marge de manœuvre quant à l'utilisation de ces films avec d'autres DM, tel que des pansements, des films de sutures, des cathéters … qui pourraient délivrer des principes actifs et ainsi éviter les effets secondaires habituellement observés. Leurs possibilités pourront peut-être pallier aux limites actuelles de prise en charge des maladies et ce pour permettre au patient d'avoir une meilleure qualité de vie.

X BIBLIOGRAPHIE

1. Morel AK, A; Garcia, A. Rapport IGAS RM2010-154P "Evolution et maîtrise de la dépense des dispositifs médicaux". 2010.

2. http://ansm.sante.fr/Activites/Mise-sur-le-marche-des-dispositifs-medicaux-et-dispositifs-medicaux-de-diagnostic-in-vitro-DM-DMIA-DMDIV/DM-classes-IIa-IIb-III-et-DMIA-Communication-et-liste/%28offset%29/4 (consulté le 17/05/17).

3. Européennes Cdc. Directive 93/42/CEE relative aux dispositifs médicaux. 1993.

4. Parlement Européen CdlUE. Directive 2007/47/CE relative aux dispositifs médicaux. 2007.

5. Européennes Cdc. Directive 90/385/CEE concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs. 1990.

6. ISO. Norme ISO 10-993 "Evaluation biologique des dispositifs médicaux". 2010.

7. Serro AP, Fernandes AC, Saramago B, Lima J, Barbosa MA. Apatite deposition on titanium surfaces--the role of albumin adsorption. Biomaterials. 1997;18(14):963-8.

8. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. Biomaterials. 2004;25(7-8):1429-38.

9. 80004-1 IT. Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1 : Core Terms. 2015.

10. 27687 IT. 2008, Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects, nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008.

11. Walters GP, I.P. The incorporation of noble metal nanoparticles into host matrix thin films: synthesis, characterisation and applications Journal of Materials Chemistry. 2009;19(5):574-90.

12. Lee CSY-GEH. Silver and manganese oxide catalysts supported on mesoporous ZrO2 nanofiber mats for catalytic removal of benzene and diesel soot. Catalysis Today. 2017;281(3):460-6.

13. Chen LB, P. ; Li, W. Preparation of a novel magnesium oxide nanofilm of honeycomb-like structure and investigation of its properties. Chemical Engineering Journal. 2016;303:588-95.

14. Jeong H, Ranallo S, Rossetti M, Heo J, Shin J, Park K, et al. Electronic Activation of a DNA Nanodevice Using a Multilayer Nanofilm. Small. 2016;12(40):5572-8.

15. ISO/TS. Norme ISO/TS 80004-2 "Nanotechnologies - Vocabulaire - Partie 2 : Nano-objets". 2015.

16. de Thier P, Bacharouche J, Duval JF, Skali-Lami S, Francius G. Atomic force microscopy analysis of IgG films at hydrophobic surfaces: a promising method to probe IgG orientations and optimize ELISA tests performance. Biochimica et biophysica acta. 2015;1854(2):138-45.

17. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(7):2050-5.

18. Alberola AP, Radler JO. The defined presentation of nanoparticles to cells and their surface controlled uptake. Biomaterials. 2009;30(22):3766-70.

19. Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2009;139(1):81-4.

20. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. Bioconjugate chemistry. 2004;15(1):79-86.

21. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. Advanced drug delivery reviews. 2009;61(6):428-37.

22. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 2006;311(5761):622-7.

23. Wang C, Wang L, Yang W. Preparation and characterization of functional inorganic/organic composite microspheres via electrostatic interaction. J Colloid Interface Sci. 2009;333(2):749-56.

24. Astruc DL, F. ; Aranzaes J.R. Nanoparticles as recyclable catalysts: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. Angewandte Chemie. 2005;44:7852-72.

25. Skebo JE, Grabinski CM, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. International journal of toxicology. 2007;26(2):135-41.

26. Petosa AR, Jaisi DP, Quevedo IR, Elimelech M, Tufenkji N. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: role of physicochemical interactions. Environmental science & technology. 2010;44(17):6532-49.

27. Tournebize J, Boudier A, Sapin-Minet A, Maincent P, Leroy P, Schneider R. Role of gold nanoparticles capping density on stability and surface reactivity to design drug delivery platforms. ACS applied materials & interfaces. 2012;4(11):5790-9.

28. Rao CN, Biswas K. Characterization of nanomaterials by physical methods. Annual review of analytical chemistry. 2009;2:435-62.

29. Meyers MA, Mishra A, Benson DJ. Mechanical properties of nanocrystalline materials. Progress in Materials Science. 2006;51(4).

30. Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. Acta Biomater. 2010;6(3):715-34.

31. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, Uo M, Akasaka T, Sato Y, et al. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. Journal of the Royal Society, Interface. 2009;6 Suppl 3:S371-88.

32. Liu Y, Wang H. Nanomedicine: Nanotechnology tackles tumours. Nature nanotechnology. 2007;2(1):20-1.

33. Jager M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R. Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. Journal of biomedicine & biotechnology. 2007;2007(8):69036.

34. Sato M, Webster TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. Expert review of medical devices. 2004;1(1):105-14.

35. Webster TJ, Ejiofor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. Biomaterials. 2004;25(19):4731-9.

36. Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. Blood. 1980;55(1):156-9.

37. Sheikh Z, Khan AS, Roohpour N, Glogauer M, Rehman IU. Protein adsorption capability on polyurethane and modified-polyurethane membrane for periodontal guided tissue regeneration applications. Materials science & engineering C, Materials for biological applications. 2016;68:267-75.

38. Lai BF, Creagh AL, Janzen J, Haynes CA, Brooks DE, Kizhakkedathu JN. The induction of thrombus generation on nanostructured neutral polymer brush surfaces. Biomaterials. 2010;31(26):6710-8.

39. Rufin MA, Barry ME, Adair PA, Hawkins ML, Raymond JE, Grunlan MA. Protein resistance efficacy of PEO-silane amphiphiles: Dependence on PEO-segment length and concentration. Acta biomaterialia. 2016;41:247-52.

40. Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, Riley BJ, Fifield LS, Jacobs JM, et al. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2007;100(1):303-15.

41. Labarre D, Vauthier C, Chauvierre C, Petri B, Muller R, Chehimi MM. Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. Biomaterials. 2005;26(24):5075-84.

42. Yang Y, Cavin R, Ong JL. Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. J Biomed Mater Res A. 2003;67(1):344-9.

43. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and fibre toxicology. 2005;2:8.

44. Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R, Moiemen NS. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries. 2007;33(8):979-85.

45. Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. Journal of pharmaceutical sciences. 2001;90(12):1927-36.

46. Ballestri M, Baraldi A, Gatti AM, Furci L, Bagni A, Loria P, et al. Liver and kidney foreign bodies granulomatosis in a patient with malocclusion, bruxism, and worn dental prostheses. Gastroenterology. 2001;121(5):1234-8.

47. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. Biomaterials. 2008;29(12):1912-9.

48. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, et al. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2006;114(3):343-7.

49. Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(20):12617-21.

50. Sorragi C, Shishido SM, Lemos ME, Marcondes S, Antunes E, Krieger MH. In vitro evaluation of the safe margin, antithrombotic and antiproliferative actions for the treatment of restenosis: Nitric oxide donor and polymers. Cell biochemistry and function. 2011;29(3):207-14.

51. Naghavi N, de Mel A, Alavijeh OS, Cousins BG, Seifalian AM. Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications. Small. 2013;9(1):22-35.

52. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. Journal of biomedical materials research. 1998;42(1):103-11.

53. Revell PA. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. Journal of the Royal Society, Interface. 2008;5(28):1263-78.

54. Billi F, Campbell P. Nanotoxicology of metal wear particles in total joint arthroplasty: a review of current concepts. Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB. 2010;8(1):1-6.

55. Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, et al. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. Chemistry & biology. 2003;10(10):961-6.

56. Firme CP, 3rd, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2010;6(2):245-56.

57. Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan VE, Fadeel B, et al. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? Pharmacology & therapeutics. 2009;121(2):192-204.

58. Mutlu GM, Budinger GR, Green AA, Urich D, Soberanes S, Chiarella SE, et al. Biocompatible nanoscale dispersion of single-walled carbon nanotubes minimizes in vivo pulmonary toxicity. Nano Lett. 2010;10(5):1664-70.

59. Stern ST, McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2008;101(1):4-21.

60. Shvedova AA, Kagan VE. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. Journal of internal medicine. 2010;267(1):106-18.

61. Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(9):3357-62.

62. Cherukuri P, Gannon CJ, Leeuw TK, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA, et al. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(50):18882-6.

63. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends in biotechnology. 2010;28(11):580-8.

64. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. Applied and environmental microbiology. 2007;73(6):1712-20.

65. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005;16(10):2346-53.

66. Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. The Journal of trauma. 2006;60(3):648-52.

67. Stevens KN, Crespo-Biel O, van den Bosch EE, Dias AA, Knetsch ML, Aldenhoff YB, et al. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. Biomaterials. 2009;30(22):3682-90.

68. Englberger L, Schaff HV, Jamieson WR, Kennard ED, Im KA, Holubkov R, et al. Importance of implant technique on risk of major paravalvular leak (PVL) after St. Jude mechanical heart valve replacement: a report from the Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial (AVERT). European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. 2005;28(6):838-43.

69. Grunkemeier GL, Jin R, Im K, Holubkov R, Kennard ED, Schaff HV. Time-related risk of the St. Jude Silzone heart valve. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery. 2006;30(1):20-7.

70. Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. Journal of medical microbiology. 2006;55(Pt 1):59-63.

71. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology advances. 2009;27(1):76-83.

72. Yin HQ, Langford R, Burrell RE. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing. The Journal of burn care & rehabilitation. 1999;20(3):195-200.

73. Dunn K, Edwards-Jones V. The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries. 2004;30 Suppl 1:S1-9.

74. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials. 2004;25(18):4383-91.

75. Erdemir A, Donnet C. Tribology of diamond-like carbon films: recent progress and future prospects. J Phys D: Appl Phys. 2006;39:R311-R27.

76. Barone PW, Yoon H, Ortiz-Garcia R, Zhang J, Ahn JH, Kim JH, et al. Modulation of single-walled carbon nanotube photoluminescence by hydrogel swelling. ACS nano. 2009;3(12):3869-77.

77. Claussen JC, Kumar A, Jaroch DB, Hasseb Khawaja M, Hibbard A, Porterfield M, et al. Nanostructuring Platinum Nanoparticles on Multilayered Graphene Petal Nanosheets for Electrochemical Biosensing. Advanced Functional Materials. 2012;22(16):3399-405.

78. Stone HA, Stroock AD, Ajdari A. Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip Annual Review of Fluid Mechanics 2004;36:381-411.

79. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. Nature. 2006;442(7101):368-73.

80. Nedjari S, Hébraud A, Eap S, Siegwald S, Mélart C, Benkirane-Jessel N, et al. Electrostatic Template-Assisted Deposition of Microparticles on Electrospun Nanofibers: Towards Microstructured Functional Biochips for Screening Applications. Rsc Adv. 2015;5:83600-7.

81. Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Onuma Y. From metallic cages to transient bioresorbable scaffolds: change in paradigm of coronary revascularization in the upcoming decade? European heart journal. 2012;33(1):16-25b.

82. Mrowietz C, Franke RP, Seyfert UT, Park JW, Jung F. Haemocompatibility of polymer-coated stainless steel stents as compared to uncoated stents. Clinical hemorheology and microcirculation. 2005;32(2):89-103.

83. Henn C, Satzl S, Christoph P, Kurz P, Radeleff B, Stampfl U, et al. Efficacy of a polyphosphazene nanocoat in reducing thrombogenicity, in-stent stenosis, and inflammatory response in porcine renal and iliac artery stents. Journal of vascular and interventional radiology : JVIR. 2008;19(3):427-37.

84. Stefanini GG, Holmes DR, Jr. Drug-eluting coronary-artery stents. The New England journal of medicine. 2013;368(3):254-65.

85. Kolh P, Windecker S. ESC/EACTS myocardial revascularization guidelines 2014. European heart journal. 2014;35(46):3235-6.

86. Rani VV, Vinoth-Kumar L, Anitha VC, Manzoor K, Deepthy M, Shantikumar VN. Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. Acta biomaterialia. 2012;8(5):1976-89.

87. Fissell WH, Fleischman AJ, Humes HD, Roy S. Development of continuous implantable renal replacement: past and future. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2007;150(6):327-36.

88. Fissell WH, Manley S, Westover A, Humes HD, Fleischman AJ, Roy S. Differentiated growth of human renal tubule cells on thin-film and nanostructured materials. ASAIO journal. 2006;52(3):221-7.

89. Muthusubramaniam L, Lowe R, Fissell WH, Li L, Marchant RE, Desai TA, et al. Hemocompatibility of silicon-based substrates for biomedical implant applications. Annals of biomedical engineering. 2011;39(4):1296-305.

90. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. Journal of neuro-oncology. 2011;103(2):317-24.

91. Mannsfeld SC, Tee BC, Stoltenberg RM, Chen CV, Barman S, Muir BV, et al. Highly sensitive flexible pressure sensors with microstructured rubber dielectric layers. Nature materials. 2010;9(10):859-64.

92. Li Z, Zhu G, Yang R, Wang AC, Wang ZL. Muscle-driven in vivo nanogenerator. Advanced materials. 2010;22(23):2534-7.

93. Kim DH, Viventi J, Amsden JJ, Xiao J, Vigeland L, Kim YS, et al. Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. Nature materials. 2010;9(6):511-7.

94. Jha RK, Jha PK, Chaudhury K, Rana SV, Guha SK. An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology. Nano reviews. 2014;5.

95. Pallotta A, Parent M, Clarot I, Ming L, Borr V, Dan P, et al. Blood Compatibility of Multilayerd Polyelectrolyte Films Containing Immobilized Gold Nanoparticles. Particle & Particle Systems Characterization. 2017;34:1600184.

96. INVS. Maladie Cardio-Neuro-Vasculaires http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-chroniques-et-traumatismes/Maladies-cardio-neuro-vasculaires/Les-cardiopathies-ischemiques (consulté en Mai 2017). 2016.

97. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. Circulation. 2011;123(8):933-44.

98. Bennett MR, O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. Pharmacology & therapeutics. 2001;91(2):149-66.

99. HAS. Utilisation des endoprothèses (stents) coronaires en France en 2014 2016.

100. Venkatraman S, Boey F. Release profiles in drug-eluting stents: issues and uncertainties. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2007;120(3):149-60.

101. Tan A, Farhatnia Y, de Mel A, Rajadas J, Alavijeh MS, Seifalian AM. Inception to actualization: next generation coronary stent coatings incorporating nanotechnology. Journal of biotechnology. 2013;164(1):151-70.

102. Bennett MR. In-stent stenosis: pathology and implications for the development of drug eluting stents. Heart. 2003;89(2):218-24.

103. Carpenter AW, Schoenfisch MH. Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. Chemical Society reviews. 2012;41(10):3742-52.

104. Acharya G, Lee CH, Lee Y. Optimization of cardiovascular stent against restenosis: factorial design-based statistical analysis of polymer coating conditions. PloS one. 2012;7(8):e43100.

105. de Mel A, Naghavi N, Cousins BG, Clatworthy I, Hamilton G, Darbyshire A, et al. Nitric oxide-eluting nanocomposite for cardiovascular implants. Journal of materials science Materials in medicine. 2014;25(3):917-29.

106. Costa RR, Mano JF. Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. Chemical Society reviews. 2014;43(10):3453-79.

107. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. Science. 1997;277(5330):1232-7.

108. Sato K, Takahashi S, Anzai J. Layer-by-layer thin films and microcapsules for biosensors and controlled release. Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. 2012;28(10):929-38.

109. Berg MC, Zhai L, Cohen RE, Rubner MF. Controlled drug release from porous polyelectrolyte multilayers. Biomacromolecules. 2006;7(1):357-64.

110. Kadlecova Z, Baldi L, Hacker D, Wurm FM, Klok HA. Comparative study on the in vitro cytotoxicity of linear, dendritic, and hyperbranched polylysine analogues. Biomacromolecules. 2012;13(10):3127-37.

111. Warnecke A, Luessen P, Sandmann J, Ikic M, Rossa S, Gutzki FM, et al. Application of a stable-isotope dilution technique to study the pharmacokinetics of human 15N-labelled S-nitrosoalbumin in the rat: possible mechanistic and biological implications. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2009;877(13):1375-87.

112. Tournebize J, Boudier A, Joubert O, Eidi H, Bartosz G, Maincent P, et al. Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis. International journal of pharmaceutics. 2012;438(1-2):107-16.

113. Tournebize J, Sapin-Minet A, Schneider R, Boudier A, Maincent P, Leroy P. Simple spectrophotocolorimetric method for quantitative determination of gold in nanoparticles. Talanta. 2011;83(5):1780-3.

114. Luo M, Boudier A, Clarot I, Maincent P, Schneider R, Leroy P. Gold Nanoparticles Grafted by Reduced Glutathione With Thiol Function Preservation. Colloid and Interface Science Communications. 2016;14:8-12.

115. Kim D, Jeong YY, Jon S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. ACS nano. 2010;4(7):3689-96.

116. Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C. Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. Advanced materials. 2010;22(4):441-67.

117. Cho C, Zacharia NS. Film stability during postassembly morphological changes in polyelectrolyte multilayers due to acid and base exposure. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2012;28(1):841-8.

118. Park JW, Shumaker-Parry JS. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2014;136(5):1907-21.

119. Lin Z, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology. 2015;7(2):189-217.

120. Cai H, Yao P. Gold nanoparticles with different amino acid surfaces: serum albumin adsorption, intracellular uptake and cytotoxicity. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2014;123:900-6.

121. Huang Z, Wang H, Yang W. Gold Nanoparticle-Based Facile Detection of Human Serum Albumin and Its Application as an INHIBIT Logic Gate. ACS applied materials & interfaces. 2015;7(17):8990-8.

122. Burgess RR. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins. Methods in enzymology. 1991;208:3-10.

123. Guzman E, Cavallo JA, Chulia-Jordan R, Gomez C, Strumia MC, Ortega F, et al. pH-induced changes in the fabrication of multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan: fabrication, properties, and tests as a drug storage and delivery system. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2011;27(11):6836-45.

124. Tortiglione C, Quarta A, Tino A, Manna L, Cingolani R, Pellegrino T. Synthesis and biological assay of GSH functionalized fluorescent quantum dots for staining Hydra vulgaris. Bioconjugate chemistry. 2007;18(3):829-35.

125. Pallotta A, Boudier A, Leroy P, Clarot I. Characterization and stability of gold nanoparticles depending on their surface chemistry: Contribution of capillary zone electrophoresis to a quality control. J Chromatogr A. 2016;1461:179-84.

Annexe 1 : **ANNEXE IX CRITÈRES UTILISÉS POUR LA CLASSIFICATION**

XI DÉFINITIONS

1. Définitions pour les règles de classification

1.1.Durée

Temporaire

Normalement destiné à être utilisé en continu pendant moins de soixante minutes.

Court terme

Normalement destiné à être utilisé en continu pendant trente jours au maximum.

Long terme

Normalement destiné à être utilisé en continu pendant plus de trente jours.

1.2.Dispositifs invasifs

Dispositif invasif

Dispositif qui pénètre partiellement ou entièrement à l'intérieur du corps, soit par un orifice du corps soit à travers la surface du corps.

Orifice du corps

Toute ouverture naturelle du corps, ainsi que la surface externe du globe oculaire, ou toute ouverture artificielle permanente, par exemple une stomie.

Dispositif invasif de type chirurgical

Dispositif invasif qui pénètre à l'intérieur du corps à travers la surface du corps, à l'aide ou dans le cadre d'un acte chirurgical.

Aux fins de la présente directive, les dispositifs, autres que ceux visés au premier alinéa, opérant une pénétration par une voie autre qu'un orifice existant du corps, sont considérés comme des dispositifs invasifs de type chirurgical.

Dispositif implantable

Tout dispositif destiné :

- à être implanté en totalité dans le corps humain
- à remplacer une surface épithéliale ou la surface de l'œil,

grâce à une intervention chirurgicale et à demeurer en place après l'intervention.

Est également considéré comme dispositif implantable tout dispositif destiné à être introduit partiellement dans le corps humain par une intervention chirurgicale et qui est destiné à demeurer en place après l'intervention pendant une période d'au moins trente jours.

1.3.Instrument chirurgical réutilisable

Instrument destiné à accomplir, sans être raccordé à un dispositif médical actif, un acte chirurgical tel que couper, forer, scier, gratter, racler, serrer, rétracter ou attacher, et pouvant être réutilisé après avoir été soumis aux procédures appropriées.

1.4.Dispositif médical actif

Tout dispositif médical dépendant pour son fonctionnement d'une source d'énergie électrique ou de toute source d'énergie autre que celle générée directement par le corps humain ou par la pesanteur et agissant par conversion de cette énergie. Les dispositifs médicaux destinés à transmettre de l'énergie, des substances ou d'autres éléments, sans modification significative, entre un dispositif médical actif et le patient ne sont pas considérés comme des dispositifs médicaux actifs. Tout logiciel autonome est considéré comme un dispositif médical actif.

1.5.Dispositif actif thérapeutique

Tout dispositif médical actif, utilisé soit seul soit en combinaison avec d'autres dispositifs médicaux, pour soutenir, modifier, remplacer ou restaurer des fonctions ou des structures biologiques en vue de traiter ou de soulager une maladie, une blessure ou un handicap.

1.6.Dispositif actif destiné au diagnostic



Tout dispositif médical actif, utilisé soit seul soit en combinaison avec d'autres dispositifs médicaux, pour fournir des informations en vue de détecter, diagnostiquer, contrôler ou traiter des états physiologiques, des états de santé, des maladies ou des malformations congénitales.

1.7.Système circulatoire central

Aux fins de la présente directive, on entend par « système circulatoire central », les vaisseaux suivants :

arteriae pulmonales, aorta ascendens, arcus aortae, aorta descendens jusqu'aux bifurcatio aortae, arteriae coronariae, arteria carotis communis, arteria carotis externa, arteria carotis interna, arteriae cerebrales, truncus brachiocephalicus, venae cordis, venae pulmonales, vena cava superior, vena cava inferior.

1.8.Système nerveux central

Aux fins de la présente directive, on entend par « système nerveux central » l'encéphale, la moelle épinière et les méninges.

XIIRÈGLES D'APPLICATION

2. Règles d'application

2.1. Les règles de classification s'appliquent en fonction de la destination des dispositifs.

2.2 Si le dispositif est destiné à être utilisé en combinaison avec un autre dispositif, les règles de classification s'appliquent séparément à chacun des dispositifs. Les accessoires sont classés en tant que tels, indépendamment des dispositifs avec lesquels ils sont utilisés.

2.3 Le logiciel informatique commandant un dispositif ou agissant sur son utilisation relève automatiquement de la même classe.

2.4 Si le dispositif n'est pas destiné à être utilisé exclusivement ou essentiellement dans une partie spécifique du corps, il doit être considéré et classé suivant l'utilisation la plus critique telle que spécifiée.

2.5 Si plusieurs règles s'appliquent au même dispositif du fait des utilisations indiquées par le fabricant, la règle qui s'applique est la plus stricte, le dispositif étant classé dans la classe la plus élevée.

2.6 Pour le calcul de la durée visée au point 1.1 de la section I, l'expression « utilisé en continu » doit être entendue au sens d'une utilisation effective ininterrompue du dispositif conformément à sa destination. Toutefois, lorsqu'un dispositif cesse d'être utilisé afin d'être remplacé immédiatement par le même dispositif ou par un dispositif identique, il convient de considérer cette nouvelle période comme une prolongation de l'utilisation continue du dispositif.

3 CLASSIFICATION

3.2 Dispositifs non invasifs

3.2.1 Règle 1

Tous les dispositifs non invasifs font partie de la classe I, sauf si l'une des règles suivantes est d'application.

3.2.2 Règle 2

Tous les dispositifs non invasifs destinés à conduire ou à stocker du sang, des liquides ou tissus corporels, des liquides ou des gaz en vue d'une perfusion, administration ou introduction dans le corps appartiennent à la classe IIa:

- s'ils peuvent être raccordés à un dispositif médical actif de la classe Iia ou d'une classe supérieure,
- s'ils sont destinés à être utilisés pour le stockage ou la canalisation du sang ou d'autres liquides corporels ou le stockage d'organes, de parties d'organes ou tissus corporels.

Dans tous les autres cas, ils appartiennent à la classe I.

3.2.3 Règle 3

Tous les dispositifs non invasifs visant à modifier la composition biologique ou chimique du sang, d'autres liquides corporels ou d'autres liquides destinés à être perfusés dans le corps appartiennent à la classe IIb, sauf si le traitement consiste en une filtration, une centrifugation ou en échanges de gaz ou de chaleur, auquel cas ils appartiennent à la classe IIa.

3.2.4 Règle 4

Tous les dispositifs non invasifs qui entrent en contact avec de la peau lésée :

- relèvent de la classe I s'ils sont destinés à être utilisés comme barrière mécanique, pour la compression ou pour l'absorption des exsudats,
- relèvent de la classe IIb s'ils sont destinés à être utilisés principalement pour des plaies comportant une destruction du derme et ne pouvant se cicatriser que par deuxième intention,
- appartiennent à la classe IIa dans tous les autres cas, y compris les dispositifs destinés principalement à agir sur le microenvironnement des plaies.

3.3 Dispositifs invasifs

3.3.1 Règle 5

Tous les dispositifs invasifs en rapport avec les orifices du corps, autres que les dispositifs invasifs de type chirurgical et qui ne sont pas destinés à être raccordés à un dispositif médical actif ou qui sont destinés à être raccordés à un dispositif médical actif de classe I :

- font partie de la classe I s'ils sont destinés à un usage temporaire,
- font partie de la classe IIa s'ils sont destinés à un usage à court terme, sauf s'ils sont utilisés dans la cavité buccale jusqu'au pharynx, dans le conduit auditif externe, jusqu'au tympan ou dans une cavité nasale auxquels cas ils font partie de la classe I,
- font partie de la classe IIb s'ils sont destinés à un usage à long terme, sauf s'ils sont utilisés dans la cavité buccale jusqu'au pharynx, dans le conduit auditif externe, jusqu'au tympan ou dans une cavité nasale et ne sont pas susceptibles d'être absorbés par la muqueuse, auxquels cas ils font partie de la classe IIa.

Tous les dispositifs invasifs en rapport avec les orifices du corps, autres que les dispositifs invasifs de type chirurgical, destinés à être raccordés à un dispositif médical actif de la classe IIa ou d'une classe supérieure, font partie de la classe IIa.

3.3.2 Règle 6

Tous les dispositifs invasifs de type chirurgical destinés à un usage temporaire font partie de la classe IIa, sauf :

- s'ils sont spécifiquement destinés à contrôler, diagnostiquer, surveiller ou corriger une défaillance du cœur ou du système circulatoire central par contact direct avec ces parties du corps, auxquels cas ils font partie de la classe III,
- s'il s'agit d'instruments chirurgicaux réutilisables, auquel cas ils font partie de la classe I,
- s'ils sont spécifiquement destinés à être utilisés en contact direct avec le système nerveux central, auquel cas ils font partie de la classe III,
- s'ils sont destinés à fournir de l'énergie sous la forme de rayonnements ionisants, auquel cas ils font partie de la classe IIb,
- s'ils sont destinés à avoir un effet biologique ou à être absorbés en totalité ou en grande partie, auxquels cas ils font partie de la classe IIb,
- s'ils sont destinés à administrer des médicaments par un mécanisme de libération et que le mode d'administration peut présenter des risques,auquel cas ils font partie de la classe IIb.

3.3.3 Règle 7

Tous les dispositifs invasifs de type chirurgical destinés à un usage à court terme appartiennent à la classe IIa, sauf s'ils sont destinés :

- spécifiquement à contrôler, diagnostiquer, surveiller ou corriger une défaillance du cœur ou du système circulatoire central par contact direct avec ces parties du corps, auxquels cas ils font partie de la classe III,
- spécifiquement à être utilisés en contact direct avec le système nerveux central, auquel cas ils font partie de la classe III

ou

- à fournir de l'énergie sous la forme de rayonnements ionisants, auquel cas ils font partie de la classe IIb

ou

- à avoir un effet biologique ou à être absorbés en totalité ou en grande partie, auxquels cas ils font partie de la classe III

ou

- à subir une transformation chimique dans le corps, sauf s'ils sont placés dans les dents, ou à administrer des médicaments, auxquels cas ils font partie de la classe IIb.

3.3.4 Règle 8

Tous les dispositifs implantables et les dispositifs invasifs à long terme de type chirurgical font partie de la classe IIb sauf s'ils sont destinés:

- à être placés dans les dents, auquel cas ils font partie de la classe IIa,
- à être utilisés en contact direct avec le cœur, le système circulatoire central ou le système nerveux central, auxquels cas ils font partie de la classe III,
- à avoir un effet biologique ou à être absorbés en totalité ou en grande partie, auxquels cas ils font partie de la classe III,
- à subir une transformation chimique dans le corps, sauf s'ils sont placés dans les dents, ou à administrer des médicaments, auxquels cas ils font partie de la classe III.

3.4 Autres règles applicables aux dispositifs actifs

3.4.1 Règle 9

Tous les dispositifs actifs thérapeutiques destinés à fournir ou échanger de l'énergie font partie de la classe IIa, sauf si leurs caractéristiques sont telles qu'ils peuvent fournir de l'énergie au corps humain ou assurer des transferts d'énergie avec celui-ci d'une manière potentiellement dangereuse, compte tenu de la nature, de la densité et du site d'application de cette énergie, auquel cas ils font partie de la classe IIb.

Tous les dispositifs actifs destinés à contrôler et à surveiller les performances des dispositifs actifs thérapeutiques de la classe IIb ou destinés à agir directement sur les performances de ces dispositifs font partie de la classe IIb.

3.4.2 Règle 10

Les dispositifs actifs destinés au diagnostic font partie de la classe IIa:

- s'ils sont destinés à fournir de l'énergie qui sera absorbée par le corps humain, à l'exception des dispositifs utilisés pour éclairer le corps du patient dans le spectre visible,
- s'ils sont destinés à visualiser la distribution de produits radiopharmaceutiques in vivo,
- s'ils sont destinés à permettre un diagnostic ou un contrôle direct des processus physiologiques vitaux, sauf s'ils sont spécifiquement destinés à surveiller les paramètres physiologiques vitaux, lorsque des variations de certains de ces paramètres, notamment ceux des fonctions cardiaques ou respiratoires ou de l'activité du système nerveux central, peuvent présenter un danger immédiat pour la vie du patient, auquel cas ils font partie de la classe IIb.

Les dispositifs actifs destinés à émettre des rayonnements ionisants et destinés au radiodiagnostic et à la radiologie interventionnelle thérapeutique, y compris les dispositifs qui

commandent ou contrôlent ces dispositifs ou agissent directement sur leurs performances, font partie de la classe IIb.

3.4.3 Règle 11

Tous les dispositifs actifs destinés à administrer dans le corps et/ou à en soustraire des médicaments, des liquides biologiques ou d'autres substances font partie de la classe IIa, sauf si cette opération est potentiellement dangereuse, compte tenu de la nature des substances administrées, de la partie du corps concernée et du mode d'administration, auquel cas ils font partie de la classe IIb.

3.4.4 Règle 12

Tous les autres dispositifs actifs font partie de la classe I.

3.5 Règles spéciales

3.5.1 Règle 13

Tous les dispositifs incorporant comme partie intégrante une substance qui, si elle est utilisée séparément, peut être considérée comme un médicament au sens de l'article 1er de la directive 2001/83/CE et qui est susceptible d'agir sur le corps par une action accessoire à celle des dispositifs font partie de la classe III.

Tous les dispositifs incorporant comme partie intégrante une substance dérivée du sang humain font partie de la classe III.

3.5.2 Règle 14

Tous les dispositifs utilisés pour la contraception ou pour prévenir la transmission de maladies sexuellement transmissibles font partie de la classe IIb, sauf s'il s'agit de dispositifs implantables ou de dispositifs invasifs à long terme, auxquels cas ils font partie de la classe III.

3.5.3 Règle 15

Tous les dispositifs destinés spécifiquement à désinfecter, nettoyer, rincer ou, le cas échéant, hydrater des lentilles de contact font partie de la classe IIb. Tous les dispositifs destinés spécifiquement à désinfecter les dispositifs médicaux font partie de la classe IIa à moins qu'ils ne soient destinés spécifiquement à désinfecter les dispositifs invasifs auquel cas ils font partie de la classe IIb

Cette règle ne s'applique pas aux produits destinés à nettoyer les dispositifs médicaux autres que les verres de contact par des moyens physiques.

3.5.4 Règle 16

Les dispositifs destinés spécifiquement à enregistrer les images de radiodiagnostic font partie de la classe IIa.

3.5.5 Règle 17

Tous les dispositifs fabriqués à partir de tissus d'origine animale ou de dérivés rendus non viables entrent dans la classe III, sauf si ces dispositifs sont destinés à entrer en contact uniquement avec une peau intacte.

3.6 Règle 18

Par dérogation aux autres règles, les poches à sang figurent dans la classe IIb.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE DE LORRAINE

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 13 juillet 2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Pallotta Arnaud

Sujet :

IMPACT DES NANOTECHNOLOGIES SUR LES DISPUSITIFS MEDICAUX

Jury :

Président : M. Igor CLAROT, Professeur
Directeur : Mme. Ariane BOUDIER, Maître de Conférences
Juges : Mme. Juliana TOURNEBIZE, Pharmacien
M. Anthony PUZO, Pharmacien
M. Dominique DECOLIN, Maître de Conférences

Vu,
Nancy, le 4 Mai 2017

Le Président du Jury Directeur de Thèse

M. CLAROT Mme BOUDIER

Vu et approuvé,
Nancy, le 22.06.2017

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,
Nancy, le 23 juin 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre METZENHARDT

N° d'enregistrement : 9912

N° d'identification :

TITRE

IMPACT DES NANOTECHNOLOGIES SUR LES DISPOSITIFS MEDICAUX

Thèse soutenue le 13 Juillet 2017

Par Arnaud PALLOTTA

Résumé

L'accroissement du développement et de la commercialisation des dispositifs médicaux implantables (type cathéters, prothèses, implants …) pose de plus en plus de problème de compatibilité sur le long terme. Pour résoudre ce problème, les nanotechnologies peuvent jouer un rôle majeur dans le développement de nouveaux dispositifs médicaux. De plus en plus d'études se penchent sur l'apport bénéfique des nanotechnologies et leur impact sur l'environnement biologique direct du dispositif.

L'objectif de ce travail consistait à créer un film nanostructuré par des nanoparticules d'or (AuNP) qui seraient piégées entre des couches de polymères (film polymérique). Le film créé a ainsi été caractérisé *via* différentes méthodes d'imageries et ses capacités à interagir avec des éléments biologiques (protéines sanguines, plasma sanguin, sang total, antioxydants …) ont été étudiées. Ces derniers ont montré une bonne hémocompatibilité ainsi qu'une très faible interaction avec les protéines ce qui en fait un bon candidat pour le développement de dispositifs médicaux innovants.

En conclusion, les films nanostructurés réalisés montrent un fort potentiel pour recouvrir des dispositifs médicaux implantables. De plus les AuNP contenus au sein des films peuvent être facilement fonctionnalisées par des principes actifs, qui pourront être libérés de façon contrôlée et améliorer la biocompatibilité du dispositif.

MOTS CLES : *Dispositifs médicaux, Nanotechnologies, Délivrance de principes actifs, Films polymériques.*

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Ariane Boudier	**CITHEFOR EA 3452**	**Expérimentale** ☒ **Bibliographique** ☐ **Thème** 3

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**
(3) – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**
5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**