

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DU
DIPLÔME DE MAÎTRISE EN GÉNIE
CONCENTRATION TECHNOLOGIE DE LA SANTÉ
M.ING.

PAR
Jean-Michel COUTU

INFLUENCE DE L'AGENT DE CONTRASTE SUR LES PROPRIÉTÉS DU
THERMOGEL DE CHITOSANE : VERS UN NOUVEL AGENT EMBOLISANT POUR
LES ANÉVRISMES

MONTRÉAL, LE 16 JANVIER 2012

 Jean-Michel Coutu, 2011



Cette licence [Creative Commons](#) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de mémoire
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Yvan Petit, président du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M Mircea Alexandru Mateescu, membre externe du jury
Département de chimie à la Faculté des sciences, UQAM

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 14 DÉCEMBRE 2011

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais offrir mes premiers remerciements à une personne sans qui rien de ce projet n'aurait été possible. Cette personne m'a été généreuse de son expertise et de ses connaissances très enrichissantes et m'a soutenu tout au long de mon projet : ma directrice de maîtrise D^r Sophie Lerouge. Dans les moments les plus difficiles, elle a su me donner confiance et le courage nécessaire pour poursuivre mes recherches et m'a inculqué les qualités requises pour être un bon chercheur. Encore une fois merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de m'épanouir avec ce projet.

La suite de mes remerciements s'adresse à mes collègues et ami(e)s du laboratoire de recherche sur les biomatériaux endovasculaires (LBeV). Je veux particulièrement souligner l'aide considérable que Cindy Charbonneau, Ahmed Fatimi, Saoussen Berrahmoune et Annie Major m'ont apportée ; vos connaissances et votre support ont été un élément essentiel dans la réussite de mon projet de maîtrise. Je suis heureux d'avoir fait la connaissance de personnes merveilleuses telles que Jérémie Barrette, Pauline Lequoy, Brigitte Dubreuil, Di Li, les techniciens et stagiaires ayant travaillé au LBeV ainsi que les membres du laboratoire de recherche en imagerie et orthopédie (LIO) qui nous ont accueillis parmi eux avec beaucoup de camaraderie. Grâce à vous tous, je repars avec de très bons souvenirs du CRCHUM.

Je voudrais faire une mention toute spéciale à ma famille et mon entourage, plus particulièrement mes parents, Jean et Danielle, ainsi que mes deux frères Louis-Philippe et Frédérik. Je voudrais aussi souligner le support inconditionnel et tant nécessaire de ma copine Marie-Maxime qui a dû m'endurer durant mes périodes de remise en question. Ils m'ont permis de devenir qui je suis aujourd'hui, m'ont encouragé et donné la motivation d'aller jusqu'au bout. Merci mille fois !!!

Je voudrais finalement remercier toutes les personnes qui ont collaboré à mon projet de recherche, Michelle St-Jacques, Alain Desjardins et Jean-Guy Gagnon de l'ETS pour

l'utilisation du rhéomètre et du microscope électronique à balayage, Jocelyne Lavoie et le Dr Gilles Soulez du Centre hospitalier de l'Université de Montréal pour l'aide apportée en radiologie, Daniel Chapdelaine et Marie-Josée Crevier de l'Université du Québec à Montréal pour le prêt de l'osmomètre et de leur temps, Éric Quenneville de Biomomentum inc. pour la machine d'essai Mach-1™ et Abdellatif Chenite et Éric Desrosiers de Biosynthec inc. pour les connaissances qu'ils m'ont transmises au sujet du chitosane.

Bonne lecture!!!

INFLUENCE DE L'AGENT DE CONTRASTE SUR LES PROPRIÉTÉS DU THERMOGEL DE CHITOSANE : VERS UN NOUVEL AGENT EMBOLISANT POUR LES ANÉVRISMES

Jean-Michel COUTU

RÉSUMÉ

La réparation endovasculaire (EVAR) est une technique peu invasive développée pour traiter les patients à risques souffrant d'un anévrisme de l'aorte abdominale (AAA). Cette opération a comme objectif d'exclure le sac anévrismal de la circulation sanguine en insérant une endoprothèse couverte. La principale complication observée avec cette intervention consiste en une persistance de perfusion sanguine dans le sac anévrismal appelée endofuites.

Il existe actuellement des agents embolisants pour traiter les endofuites, mais leur succès reste mitigé. L'objectif de travail consistait à développer un agent embolissant à base de chitosane pour emboliser le sac anévrismal. Le chitosane n'étant pas radio-opaque, un agent de contraste (AdC) devait être ajouté à la formulation afin de permettre le suivi de l'injection lors de l'embolisation.

Cette recherche avait comme objectif de déterminer l'influence de l'incorporation d'un AdC dans la solution de chitosane et de valider la possibilité d'utiliser ce thermogel pour emboliser les AAA. Pour atteindre cet objectif, des essais de caractérisation ont permis de vérifier l'effet de trois générations d'AdC sur les propriétés viscoélastiques de la solution, la cinétique de gélification, la résistance mécanique du gel ainsi que sa radio-opacité, le potentiel cytotoxique et la vitesse de relargage de l'AdC.

Tous les AdC étudiés modifient les propriétés du gel mais sans empêcher la gélification. De plus, les résultats suggèrent qu'en modifiant le choix de chitosane, des solutions composées de 20 % v/v en AdC possédant une viscosité, une cinétique de gélification, une pharmacocinétique de l'AdC et une biocompatibilité adéquate pour leur utilisation dans les AAA tout en étant visibles en radiologie peuvent être obtenues.

Ce projet a permis de développer un hydrogel de chitosane radio-opaque permettant la visualisation *in vivo* pour l'embolisation des AAA.

Mots-clés : chitosane, embolisation, thermogel radio-opaque, endofuite, rhéologie, anévrisme de l'aorte abdominale

INFLUENCE DE L'AGENT DE CONTRASTE SUR LES PROPRIÉTÉS DU THERMOGEL DE CHITOSANE : VERS UN NOUVEL AGENT EMBOLISANT POUR LES ANÉVRISMES

Jean-Michel COUTU

ABSTRACT

Endovascular aneurysm repair (EVAR) is a minimally invasive alternative to open surgical repair developed to treat high risk patients suffering from abdominal aortic aneurysm (AAA). The goal of the procedure is to exclude the aneurismal sac from blood circulation by deploying a covered stent called stent-graft. The major limitation of this technic is the occurrence of frequent complications, in particular persistence of blood perfusion in the aneurysm, called endoleaks.

Embolizing agents have been developed to occlude flow and prevent endoleaks, but their effectiveness is limited. In this work we propose to create a novel embolizing agent based on chitosan thermogels. Since chitosan is not radiopaque, a contrast agent (AdC) needed to be added to the base solution to allow good control and follow-up of the embolisation.

The aims of this research were to determine the influence of the three generations of AdC on the chitosan solution and confirm the feasibility to use it for the embolisation of AAA. To reach these objectives, the viscoelastic properties and gelation kinetic of the solutions and the mechanical properties, the cytotoxic potential and the release rate of the AdC of the gels were evaluated.

Formulations made of 20% v/v of AdC obtained good results for their use like embolic agents compared with products presently used. Their viscosity and kinetic of gelation were sufficiently high to avoid migration of the solution in the peripheral system and the pharmacokinetic of the AdC allowed a good temporary visualization while the gel has a low cytotoxic effect.

This project confirms the feasibility of using a radiopaque thermogelling chitosan solution for the embolisation of AAA and permits a better understanding of the role of AdC on the thermogel properties.

Keywords : chitosan, embolic agent, radiopaque thermogel, endoleak, abdominal aortic aneurysm

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1.1 Anévrisme de l'aorte abdominale	5
1.1.1 La pathologie	5
1.1.2 Traitements chirurgicaux	6
1.1.2.1 Opération chirurgicale standard	7
1.1.2.2 Réparation endovasculaire (EVAR)	7
1.1.3 Les endofuites	9
1.1.3.1 Interventions possibles	12
1.2 Les agents embolisant existants	13
1.2.1 Critère pour un embolisant idéal pour les AAA	13
1.2.2 Les spirales métalliques (coils)	15
1.2.3 Poly(éthylène et alcool vinylique)	16
1.2.3.1 Onyx®	16
1.2.4 Les acrylates	18
1.2.4.1 Histoacryl® et TruFill®	18
1.2.4.2 L'Ultragel	20
1.2.5 L'alginate de calcium	20
1.2.6 Autres	22
1.3 Les hydrogels	23
1.3.1 Définition des gels et hydrogels	23
1.3.2 Utilisation dans le domaine médical	25
1.3.3 Mode de formation des hydrogels	26
1.3.3.1 Concentration en polymère	26
1.3.3.2 Réticulation ionique	27
1.3.3.3 Réticulation covalente	28
1.3.4 Caractérisation des hydrogels	28
1.3.4.1 Caractérisation mécanique	29
1.3.4.2 Caractérisation physicochimique et morphologique	31
1.4 Le chitosane	31
1.4.1 La structure chimique	32
1.4.2 Le degré de désacétylation (DDA)	32
1.4.3 La masse moléculaire	33
1.4.4 La solubilité	33
1.4.5 La biodégradabilité	34
1.4.6 Propriétés biologiques	35
1.5 L'hydrogel de chitosane	36
1.5.1 Principe de formation	37
1.5.1.1 La mise en solution du chitosane	37
1.5.1.2 Le mélange avec le β GP	38

1.5.1.3	Processus de gélification.....	39
1.5.2	Influence des différents paramètres	39
1.5.2.1	Le degré de désacétylation (DDA)	40
1.5.2.2	La masse moléculaire moyenne	41
1.5.2.3	Les concentrations	41
1.5.2.4	La force ionique	42
1.5.2.5	La stérilisation.....	42
1.6	Les agents de contraste (AdC)	43
1.6.1	1 ^{re} génération.....	43
1.6.2	2 ^e génération	44
1.6.3	3 ^e génération	44
1.7	Objectifs.....	44
CHAPITRE 2 EXPÉRIMENTATION.....		47
2.1	Synthèse du thermogel de chitosane	47
2.1.1	Matériel	47
2.1.2	Préparation de la solution.....	50
2.2	Essais rhéométriques.....	51
2.2.1	Géométrie cylindres concentriques.....	52
2.2.1.1	La viscosité initiale	52
2.2.1.2	Le temps de gélification.....	53
2.2.1.3	La vitesse de gélification	54
2.2.2	Géométrie plan-plan.....	55
2.3	Essais en compression.....	55
2.4	Essais tomodensitométriques	59
2.4.1	Radio-opacité des gels	60
2.4.2	Le relargage de l'agent radio-opaque	61
2.5	Microscopie électronique à balayage.....	61
2.6	La cytotoxicité indirecte par extrait	62
2.7	Osmolalité	63
2.8	Analyse statistique	64
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		65
3.1	Création des solutions thermodépendantes	65
3.2	Viscosité des solutions.....	66
3.3	Temps de gélification et modules à la gélification	67
3.4	Vitesse de gélification.....	69
3.5	Les propriétés mécaniques des gels après 1 semaine de gélification à 37 °C.....	70
3.5.1	Module de conservation (G') des gels	70
3.5.2	Module sécant en compression des gels	71
3.5.3	Dureté et perte de dureté des gels	72
3.5.4	Cohésion et perte de cohésion des gels.....	73
3.6	Radio-opacité des gels	75
3.7	Relargage de l'AdC.....	76
3.8	Microscopie électronique à balayage.....	77

3.9	Cytotoxicité et osmolalité	80
CHAPITRE 4 DISCUSSION		83
4.1	Effet des AdC sur la gélification des thermogels.....	83
4.1.1	Viscosité des solutions.....	83
4.1.2	Temps et vitesse de gélification.....	84
4.2	Mécanismes expliquant l'effet des AdC sur le comportement de la solution.....	87
4.2.1	La taille et la concentration molaire des molécules de l'AdC	88
4.2.2	La tonicité des AdC	90
4.2.3	Utilisation d'un AdC ionique.....	92
4.3	Le chitosane sous forme de gel.....	93
4.3.1	Résistance mécanique des gels	93
4.3.2	La radio-opacité et la vitesse de relargage	94
4.4	Effet de l'AdC sur le comportement du gel	95
4.4.1	La taille et la concentration molaire des molécules de l'AdC	96
4.4.2	La tonicité des AdC	98
4.5	L'effet toxique des extraits	100
4.6	Limite de la recherche.....	101
4.7	Choix d'un AdC pour l'élaboration de l'agent embolisant.....	102
4.8	Recherches futures	103
CONCLUSION		105
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		107

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 2.1	Caractéristique des agents de contraste étudiés49
Tableau 2.2	Formulations de chitosane avec β GP et AdC étudiées51
Tableau 2.3	Valeur des paramètres lors de la radiographie CT scan.....60
Tableau 2.4	Paramètres des échantillons testés lors du CT scan61
Tableau 3.1	pH des solutions de chitosane et d'AdC (CH/AdC) et des solutions de chitosan, β GP et AdC (CH/AdC/ β GP)65
Tableau 3.2	Concentration en iode et densité Hounsfield des différents gels (DDA : 82,8 %) avec 0 ou 20 % v/v en AdC76
Tableau 4.1	Propriétés des agents embolisant existants et celles du gel de chitosane (DDA 82,8 %) obtenues durant cette étude86

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Représentation d'un anévrisme de l'aorte abdominale6
Figure 1.2	Chirurgie endovasculaire pour le traitement des AAA.....7
Figure 1.3	Réparation endovasculaire (EVAR)8
Figure 1.4	Schématisation des différents types d'endofuites Adaptée de Elias et Upchurch (2008)10
Figure 1.5	A) molécule d'alginate, B) principe de formation du gel d'alginate et C) technique de gélification par cathéter à double lumière pour l'injection21
Figure 1.6	Dépendance des modules G' et G" en fonction de la fréquence d'un gel de chitosane 2 %25
Figure 1.7	Structure d'un hydrogel formé par A) des interactions ioniques et B) un complexe polyélectrolyte27
Figure 1.8	Différentes structures d'hydrogel formé par réticulation covalente A) un polymère réticulé avec lui-même B) un réseau polymérique hybride (HPN) et C) un réseau polymérique hybride interpénétrant (RPI)28
Figure 1.9	La viscoélasticité représentée par un système ressort/amortisseur selon le modèle de Kelvin30
Figure 1.10	Les deux monomères composant le chitosane32
Figure 1.11	Solution de chitosane à 22°C qui se gélifie à 37°C37
Figure 1.12	Évaluation de la température de précipitation (T_p) A) par transmittance laser et B) en rhéométrie Adaptées de Lavertu, Filion et Buschmann (2008) et Chenite <i>et al.</i> (2000)40
Figure 2.1	Structure moléculaire des molécules actives des agents de contraste A) sel de méglumine iothalamate (Conray [®]), B) iopamidol (Isovue [®]) et C) iodixanol (Visipaque [®])50
Figure 2.2	Rhéomètre MCR 301 avec géométrie cylindres coaxiaux52
Figure 2.3	Courbe standard d'un essai rhéométrique avec une géométrie cylindres coaxiaux et détermination du t_{gel} et de la pente de gélification54

Figure 2.4	Schéma représentant le montage pour les essais de compression non confinée	57
Figure 2.5	Exemple d'un résultat suite à l'essai de compression	57
Figure 2.6	A) Exemple de l'évaluation de la dureté et de l'énergie de cohésion et B) des modules sécants en compression à 20 et 30 % de déformation.....	59
Figure 2.7	Disposition des échantillons dans une plaque P12 pour les essais CT scan et exemple de résultat tomodensitométrique	60
Figure 3.1	Évolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') à 37 °C des solutions de chitosane (DDA : 82,8 %) sans AdC (A), 10 % (B), 20 % (C), 30 % d'Isovue® (D), 20 % en Visipaque® (E) et 20 % en Conray® (F). La courbe de gélification avec le chitosane de DDA 94,4% avec 20% v/v en Isovue® est également présentée (C).....	66
Figure 3.2	Viscosité des solutions (DDA 82,8 % et 94,4 %) en fonction A) de la concentration en Isovue®. (Il y a une différence significative entre toutes les formulations pour DDA 82,8 % ; $p<0,05$) et B) du type d'AdC. # différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$).....	67
Figure 3.3	Temps de gélification ($G'=G''$) et valeurs des modules G' et G'' à la gélification en fonction de la concentration en Isovue® (A, B) et du type d'AdC (C, D) pour les 2 types de chitosane (DDA 82,8 % et 94,4 %). # : différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$) et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 (DDA 82,8 %, $p<0,05$).....	68
Figure 3.4	Pente de gélification des solutions de chitosane de DDA 82,8% et 94,4% en fonction de la concentration en Isovue® (A, C) et du type d'AdC (B, D). # représente une différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$) et * par rapport à la solution CH_ISO_20 (DDA 82,8 %, $p<0,05$).....	70
Figure 3.5	Module de conservation (G') après 1 semaine de gélification des solutions (DDA 82,8 % et 94,4 %) en fonction de A) de la concentration en Isovue® et B) du type d'AdC.....	71
Figure 3.6	Module sécant en compression des gels (DDA 82,8 %) en fonction A) de la concentration en Isovue® ($p<0,05$ pour toutes les formulations à toutes les déformations par rapport au contrôle CH) et B) du type d'AdC. Il n'a y pas de différence significative entre les AdC testés	72

Figure 3.7	Dureté et perte de dureté entre la 1 ^{ère} et la 2 ^{nde} compression, en fonction de la concentration en Isovue® (A,B) et du type d'AdC (C,D) (DDA : 82,8 %) # différence significative avec le contrôle CH et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 (p<0,05).....	73
Figure 3.8	Énergie de cohésion et perte de cohésion entre la 1 ^{ère} et la 2 ^{nde} compression en fonction de la concentration en Isovue® (A, B) et du type d'AdC (C,D) (DDA 82,8 %). # différence significative par rapport au contrôle CH et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 (p<0,05).....	74
Figure 3.9	Test préliminaire pour déterminer la concentration en AdC (Isovue®) à étudier	75
Figure 3.10	Unités Hounsfield des gels (DDA 82,8 %) en fonction du type d'AdC à une concentration de 0 ou 20 % v/v.....	76
Figure 3.11	A) Unités Hounsfield en fonction du temps d'exposition à une solution saline et B) la perte de densité Hounsfield entre les intervalles d'expositions des gels (DDA : 82,8 %) avec 20 % v/v en AdC	77
Figure 3.12	Images par MEB de la morphologie des gels (DDA 82,8 %) en fonction de la concentration en Isovue®	78
Figure 3.13	Images par MEB de la morphologie des gels (DDA 82,8 %) avec 20 % v/v en AdC en fonction du type d'AdC	79
Figure 3.14	A) Viabilité cellulaire présentée sous forme de fluorescence normalisée lors des essais de cytotoxicité par extraits et B) osmolalité de ces extraits produits par l'incubation en milieu de culture des gels (DDA 82,8 %) sans ou avec 20 % v/v en AdC. # différence significative par rapport au milieu de culture (24 h), + par rapport à CH (24 h), * par rapport à CH_ISO_20 (24 h), & par rapport au milieu de culture (48 h) et \$ par rapport à CH (48 h) (p<0,05)	80
Figure 4.1	Différentes interactions possibles entre un AdC et un polymère.....	88
Figure 4.2	Schéma représentant l'écrantage électrostatique (blindage) des groupements amine chargés positivement avec l'ajout de sel dans la solution de chitosane Adaptée de Chiu <i>et al.</i> (2009)	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

^a	Exposant ^a dans l'équation de Mark-Houwink
AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AdC	Agent de contraste
AMI	Artère mésentérique inférieure
APV	Alcool polyvinyle
β GP	Sel disodique de β -glycérophosphate
CAS	numéro CAS (Chemical Abstract Service)
CH	Chitosane
-CH	Groupe fonctionnel méthine
CHUM	Centre hospitalier de l'Université de Montréal
COCH ₃	Groupe fonctionnel acétyle
Cl ⁻	Ion chlorure
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CRCHUM	Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CT scan	Scan tomodensitométrique
DDA	Degré de désacétylation
DMSO	Diméthyl sulfoxide
ETS	École de technologie supérieure
EVAR	Réparation endovasculaire
EVOH	Poly(éthylène et alcool vinylique)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G'	Module de conservation

G''	Module de perte
gMSC	Cellule souche mésenchymateuse
H ⁺	Ion hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HPN	Réseau polymérique hybride
Hz	Hertz
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ISCA	Isobutyl cyanoacrylate
K	Constante K dans l'équation de Mark-Houwink
L929	Cellule fibroblaste de souris
MAV	Malformation artérioveineuse
MCBL	Microscope confocal à balayage laser
MEB	Microscopie électronique à balayage
Mw	Masse moléculaire moyenne
NaOH	Hydroxyde de sodium
NBCA	N-butyl-2-cyanoacrylate
-NH ₂	Amine primaire
-NH ₃ ⁺	Ion ammonium quaternaire
PBS	Tampon phosphate salin
PEC	Complexe polyélectrolyte
RPI	Réseau polymérique semi ou complètement interpénétrant
UQAM	Université du Québec à Montréal

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

α	Degré d'ionisation
α_p	État d'ionisation à la précipitation
γ	Gamma
δ	Angle de phase
k^{-1}	Longueur d'écrantage électrostatique de Debye
L_p	Longueur de persistance
M	Concentration molaire
pK_0	Constante de dissociation acide intrinsèque
pK_a	Constante de dissociation acide
η	Viscosité
η^*	Viscosité complexe
$[\eta]$	Viscosité intrinsèque
σ	Contrainte
t_{gel}	Temps de gélification
T_p	Température de précipitation
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement
ω	Fréquence

INTRODUCTION

La médecine a comme objectif premier de lutter contre les multiples pathologies affligeant l'être humain pour en améliorer la qualité de vie. Elle s'est développée et a grandement évolué tout en cherchant à réduire au maximum ses impacts négatifs sur la vie des patients afin de leur permettre une guérison rapide et leur procurer une vie normale le plus rapidement possible. Pour y parvenir, de plus en plus d'interventions sont développées de façon à ce qu'elles soient peu invasives pour le patient.

Dans le contexte des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA), une dilatation permanente de l'aorte abdominale pouvant mener à la rupture de l'artère et à une hémorragie mortelle, le Dr Parodi et ses collaborateurs ont développé une technique peu invasive, la réparation endovasculaire (EVAR) (Parodi, Palmaz et Barone, 1991). Cette opération consiste à insérer par cathétérisme une endoprothèse couverte au niveau de l'AAA et d'exclure le sac anévrismal de la circulation sanguine pour stopper sa progression. Cette technique, quoique très intéressante pour les personnes à haut risque face à une opération chirurgicale, se heurte encore à ce jour à de fréquentes complications qui amenuisent le taux de succès. La principale limitation responsable de l'échec de l'EVAR est la réperfusion du sac anévrismal par le sang, que l'on appelle endofuite. L'intervention la plus intéressante pour traiter certaines de ces fuites semble être l'embolisation du sac anévrismal à l'aide d'un agent embolisant.

Il existe actuellement plusieurs agents embolisant commerciaux approuvés pour le traitement des anévrismes intracrâniens et les malformations artérioveineuse (MAV). Cependant, ces pathologies sont très différentes des AAA en raison de leurs caractéristiques. Les produits sur le marché ne sont pas développés ni approuvés pour traiter les AAA et ne sont pas adéquats pour traiter les endofuites. Plusieurs équipes de recherche travaillent sur des produits permettant d'accomplir une embolisation complète du sac anévrismal, mais ils connaissent un succès mitigé.

Dans cette optique, notre équipe de recherche du laboratoire sur les biomatériaux endovasculaire (LBEV) s'est donnée comme projet de développer un produit efficace et sécuritaire permettant l'embolisation complète du sac anévrismal. Le laboratoire s'est intéressé à une nouvelle classe de biomatériaux qui gagnent en popularité, les hydrogels. Ces matériaux sont très intéressants dans le domaine médical, parce qu'ils possèdent généralement une très bonne biocompatibilité, qu'ils peuvent être injectés sous forme liquide par cathéter, tout en se gélifiant une fois *in vivo*, et qu'il est possible de contrôler dans une certaine mesure leur dégradation en fonction du temps de résidence désiré. Plus particulièrement, le laboratoire s'est intéressé à l'hydrogel thermogélifiant formé de chitosane (CH) et de sel disodique hydrate de β -glycérophosphate (β GP) développé par l'équipe de recherche de Biosyntech inc., dont le D^r Chenite faisait partie (Chenite *et al.*, 2000).

Le thermogel de chitosane pourrait être un très bon candidat pour l'embolisation des AAA, car il est sous forme liquide à la température ambiante, allouant la possibilité de l'injecter par cathéter, et qu'il se gélifie à la température du corps pour former un gel avec des propriétés mécaniques intéressantes. Le second avantage provient de la grande influence qu'ont les caractéristiques du chitosane sur son comportement en solution et sa gélification. Ça devient un avantage puisqu'il y a possibilité d'optimiser et de moduler la solution afin d'obtenir des propriétés adéquates pour effectuer une embolisation complète et sécuritaire. Cependant, le chitosane n'est pas radio-opaque. Ce critère est primordial pour faire un suivi de l'injection par rayons X lors de l'embolisation. Le suivi permet de s'assurer qu'il n'y ait pas de migration dans le système cardiovasculaire et que l'oblitération soit complète, élément très important pour obtenir une embolisation efficace.

Pour résoudre ce problème, l'ajout d'un agent de contraste (AdC) dans la solution thermogélifiante de chitosane devient un élément essentiel. Toutefois, l'addition d'un nouveau produit peut avoir des conséquences importantes sur le comportement de la solution, le processus de gélification et les propriétés mécaniques du gel. Dans cette optique, la recherche actuelle tentera de comprendre les modifications engendrées au système de

CH/ β GP suite à l'addition d'AdC. Après l'analyse des résultats, il sera possible de déterminer s'il est viable de développer le thermogel de chitosane radio-opaque pour l'embolisation des AAA.

Ce rapport se compose de quatre parties. Tout d'abord, au chapitre 1, une revue de la littérature détaille ce que sont les anévrismes et les complications pouvant y être reliées, recensant les traitements existants et les agents embolisants actuels, décrit les modes de formation et de caractérisation des gels et, finalement, résume les connaissances au sujet du chitosane. Le chapitre 2 décrit le matériel et les méthodes utilisées pour accomplir l'étude. Les résultats obtenus durant les expérimentations sont compilés au chapitre 3 alors que l'analyse et la discussion de ces résultats sont formulées au chapitre 4.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Anévrisme de l'aorte abdominale

1.1.1 La pathologie

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des principales causes de mortalité au Canada et les anévrismes de l'aorte abdominale jouent un rôle important dans cette statistique. L'AAA, une dilatation permanente et localisée de l'artère abdominale (Johnston *et al.*, 1991), se produit généralement entre les artères rénales et les artères iliaques (voir Figure 1.1) (Drury *et al.*, 2005). Les mécanismes et facteurs de risques sont nombreux mais ne seront pas détaillés ici. La croissance de l'anévrisme mènera éventuellement à la rupture de l'artère, évènement qui est mortel dans la majorité des cas (Drury *et al.*, 2005; Kniemeyer *et al.*, 2000; Thompson, 2003). L'AAA seraient ainsi la 14^e cause de décès en Amérique du Nord et la 10^e pour les personnes blanches âgées de 65 à 75 ans (année 2006) (Eliason et Upchurch, 2008). L'âge avancé du patient, le fait d'être un homme, la consommation de tabac, la race, l'embonpoint, la présence d'athérosclérose ou d'hypertension sont des facteurs aggravant les risques d'être atteint de cette pathologie (Barnett *et al.*, 2009; Eliason et Upchurch, 2008).

La croissance silencieuse et généralement asymptomatique de cette pathologie est responsable du haut taux de décès qui lui est relié (Société canadienne de chirurgie vasculaire, 2008). Bien que la découverte d'une AAA soit généralement fortuite, dans certains cas, une douleur abdominale vive et une masse pulsative peuvent être ressenties (Drury *et al.*, 2005).

Normalement, une aorte saine présente un diamètre d'environ 2 cm chez l'homme (Allison *et al.*, 2008; Société canadienne de chirurgie vasculaire, 2008) et, par convention, elle est

considérée comme anévrismale lorsqu'elle atteint 3 cm (Frank *et al.*, 1997). Avant d'atteindre 5,5 cm, seul un suivi périodique est nécessaire pour évaluer l'évolution de la pathologie (Dolmatch et Blum, 2000). Au dessus de ce diamètre, ou avec un taux de croissance de 4 à 5 mm par année, une stratégie pour traiter et ralentir le développement de l'anévrisme est établie. Dans le cas où il est impossible de contrôler l'évolution de la pathologie, la dernière solution réside dans une opération chirurgicale.

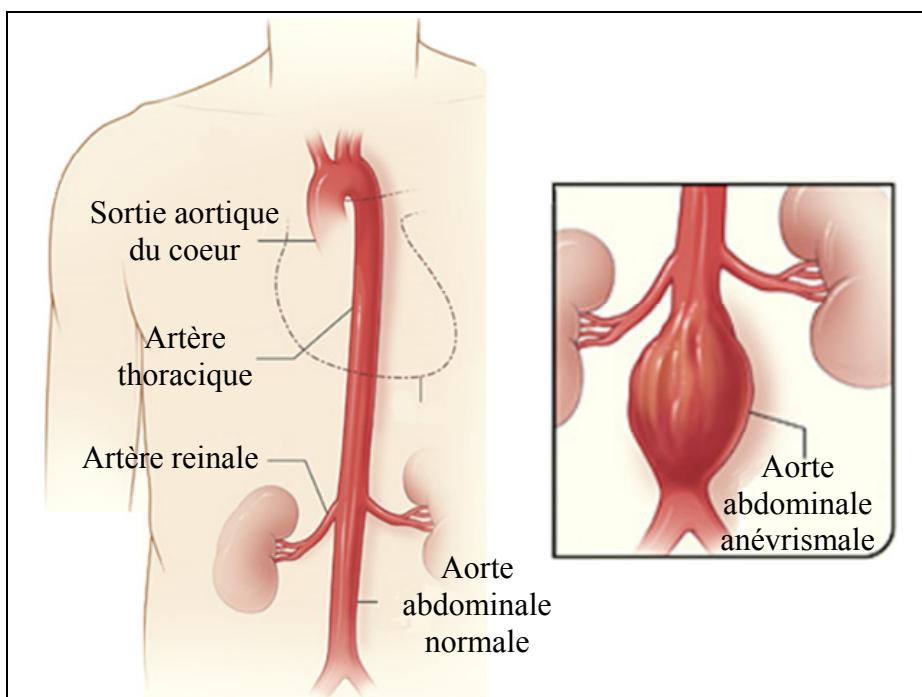


Figure 1.1 Représentation d'un anévrisme de l'aorte abdominale

Adaptée du site internet du National Institutes of Health :

<http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/index.html>

1.1.2 Traitements chirurgicaux

Il existe actuellement deux techniques opératoires, soit la chirurgie standard ou la réparation endovasculaire (EVAR). Le but premier de ces opérations est d'exclure le sac anévrismal de la circulation sanguine tout en préservant le plus possible les vaisseaux parents (Barnett *et al.*, 2009; Bush *et al.*, 2001).

1.1.2.1 Opération chirurgicale standard

La technique standard pour traiter les AAA est l'opération chirurgicale. Elle consiste à remplacer la portion malade du vaisseau par un tube polymérique (prothèse vasculaire) qui est suturé en place pour recréer la forme tubulaire de l'aorte (*voir Figure 1.2*) (Creech, 1966). L'opération chirurgicale est invasive et un haut taux de morbidité y est relié, notamment à cause du clampage de l'aorte requis pour stopper le flux sanguin durant la suture (Drury *et al.*, 2005).

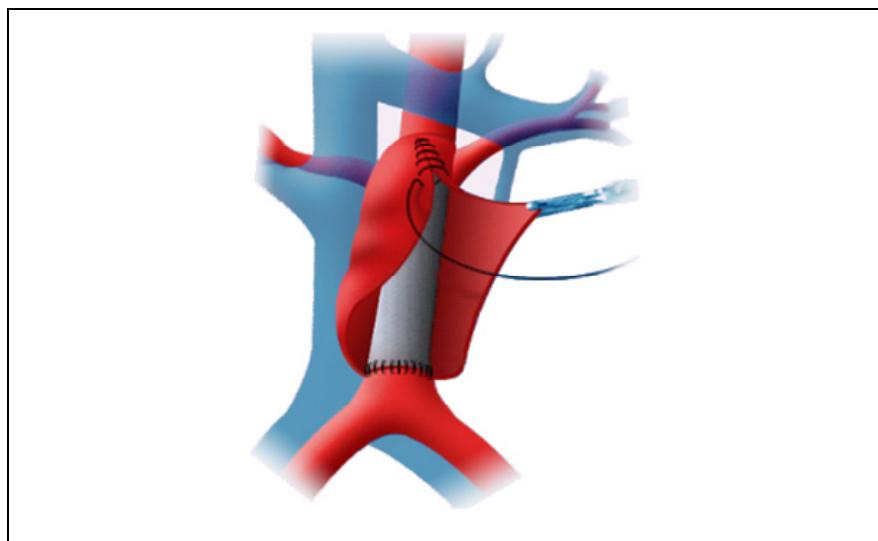


Figure 1.2 Chirurgie endovasculaire pour le traitement des AAA

Tirée du site internet de Paraskevas sur le site :

<http://www.dr-paraskevas.com>

1.1.2.2 Réparation endovasculaire (EVAR)

La réparation endovasculaire a été développée pour réduire la morbidité reliée à l'opération chirurgicale lors du traitement des AAA. L'EVAR est une technique peu invasive initiée dans les années 1990 par le Dr Parodi (Conrad *et al.*, 2009; Parodi, Palmaz et Barone, 1991). Cette technique consiste à planter par voie artérielle une endoprothèse couverte à l'intérieur de l'anévrisme afin de limiter la circulation sanguine (*voir Figure 1.3*) (Drury *et*

al., 2005). Pour éviter d'ouvrir le patient, l'opération se fait via les vaisseaux sanguins, la prothèse étant montée sur un cathéter, guidée par imagerie, puis déployée par le gonflement d'un ballonnet. Contrairement à la prothèse vasculaire classique, l'endoprothèse est composée d'une structure métallique recouverte d'un tissu polymérique et c'est la force radiale exercée par cette structure métallique qui permet de maintenir la prothèse en place.

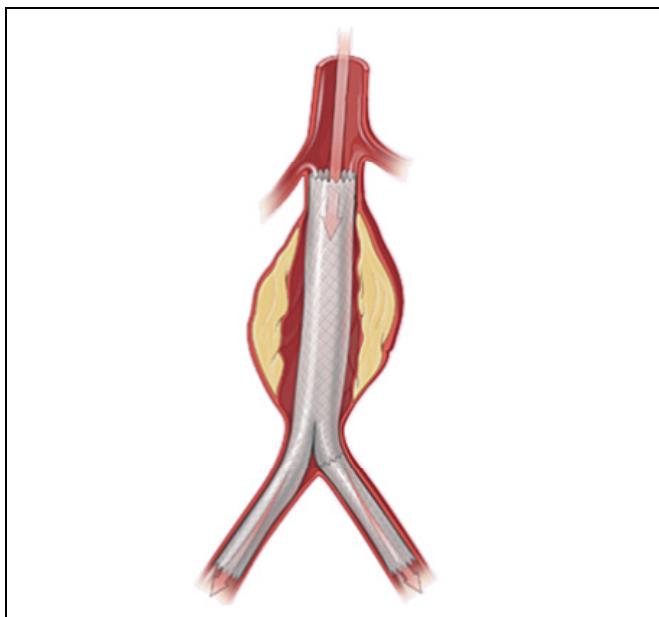


Figure 1.3 Réparation endovasculaire (EVAR)

Tirée du site internet de Paraskevas sur le site :

<http://www.dr-paraskevas.com>

En 2000, l'EVAR s'adressait surtout aux personnes à risques, mais selon l'étude de Drury *et al.* (2005) ce chiffre pourrait atteindre 43.1 % à condition de réduire les complications qui y sont reliées.

Les avantages de l'EVAR sont notables : plus faible morbidité et mortalité, temps de réhabilitation diminué, absence de cicatrice et diminution de la perte sanguine à court terme (Drury *et al.*, 2005). Selon la revue de Drury *et al.* (2005), la mortalité après 30 jours reliée à l'opération est réduite de 4,7 % pour la chirurgie standard à 1,6 % (1,5 % selon Conrad *et al.* (2009)) avec l'EVAR selon trois études à témoin randomisé (Drury *et al.*, 2005). Toujours

selon la même revue, en utilisant 15 études non randomisées, le taux passe de 3,9 % pour la chirurgie standard à 2,0 % pour l'EVAR (Drury *et al.*, 2005). Toutefois, à plus long terme, la fréquence des complications observées avec EVAR, notamment les endofuites, annule son avantage sur la chirurgie standard.

1.1.3 Les endofuites

Les endofuites sont la principale cause de la progression du volume anévrismal et de l'insuccès de l'EVAR (Drury *et al.*, 2005; Hiraki *et al.*, 2005; Jonker, Aruny et Muhs, 2009). Se formant dans 4 à 50 % des EVAR, la majorité de celles-ci se résorbe d'elles-mêmes dans les 3 premiers mois sans intervention externe, mais produisent tout de même une augmentation du sac anévrismal dans 7,1 % des cas (Baum *et al.*, 2003; Bush *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2011; Hiraki *et al.*, 2005; Jonker, Aruny et Muhs, 2009; Soulez *et al.*, 2008; Stavropoulos *et al.*, 2005). Les endofuites sont classées en 5 types distincts (type I, II, III, IV et V) selon l'emplacement et la cause (*voir* Figure 1.4). Certaines d'entre elles sont plus problématiques, comme les fuites de types I et III, car elles augmentent considérablement les risques de rupture du sac anévrismal et nécessitent une intervention immédiate (Grisafi *et al.*, 2010; Jonker, Aruny et Muhs, 2009; Kirby et Goodwin, 2003; Ling *et al.*, 2007).

Type I : La fuite de type I se caractérise par une perfusion du sac anévrismal au niveau du collet proximal (type Ia) ou distal (type Ib) à l'interface prothèse-artère (Drury *et al.*, 2005; Kirby et Goodwin, 2003; Soulez *et al.*, 2008; Stavropoulos *et al.*, 2005). Elle est considérée comme l'une des endofuites les plus courantes, mais aussi des plus urgentes à traiter. La cause principale serait un scellement déficient au niveau du collet dû à un manque de guérison (Martin *et al.*, 2001; Soulez *et al.*, 2008). L'angulation du collet de l'anévrisme, le lieu d'attache non circulaire, l'absence de thrombus, la présence de calcification, la progression de l'anévrisme, un mauvais positionnement, la migration de la prothèse ou encore une sous dilatation de la prothèse lors de l'installation peuvent produire un scellement déficient (Kirby et Goodwin, 2003).

Une étude multicentrique dénotait une incidence d'environ 12,3 % (10 % (Grisafi *et al.*, 2010), 15-21 % (Faries *et al.*, 2003)), peu importe le délai d'observation, et représenterait entre 37 et 43 % des endofuites observées (Peynircioğlu *et al.*, 2008; Soulez *et al.*, 2008). Selon l'étude de Conrad *et al.*, elles ont été la cause d'une ré-intervention dans une proportion de 28 % des cas (Conrad *et al.*, 2009).

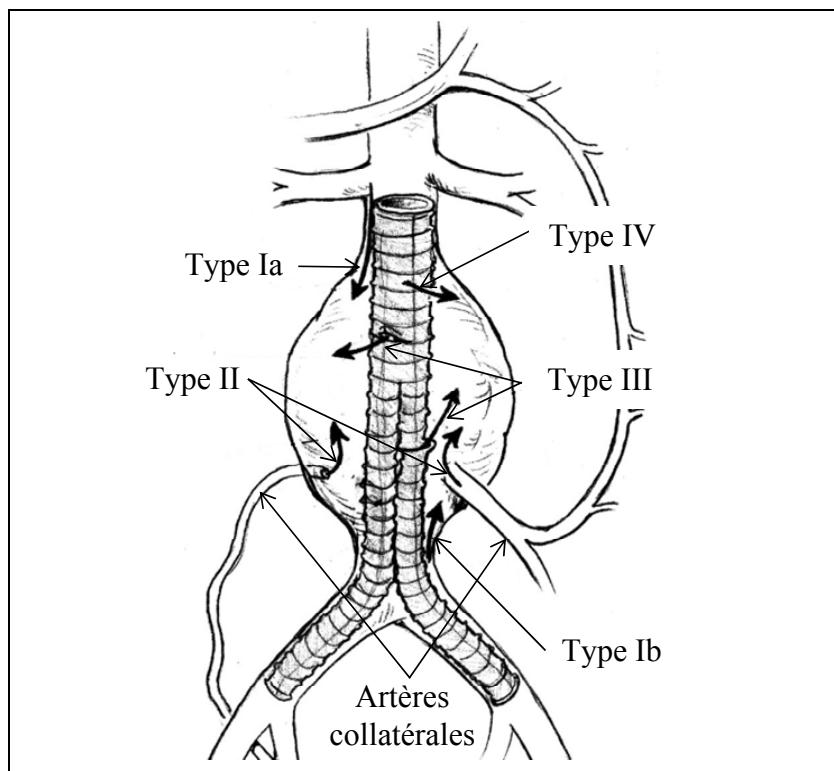


Figure 1.4 Schématisation des différents types d'endofuites
Adaptée de Eliason et Upchurch (2008)

Type II : La fuite de type II provient des artères collatérales du sac anévrismal (Bush *et al.*, 2001; Kasirajan *et al.*, 2003; Stavropoulos *et al.*, 2005). Il y a généralement une baisse de pression dans le sac anévrismal suite à l'EVAR et il peut y avoir la formation d'une circulation rétrograde du sang vers le sac anévrismal (Drury *et al.*, 2005; Kasirajan *et al.*, 2003; Kirby et Goodwin, 2003; Martin *et al.*, 2001; Stavropoulos *et al.*, 2005). Les artères impliquées dans ce type de fuite sont les artères lombaires, hypogastriques, sacrales, gonadiques ou mésentériques inférieures (AMI) (Bush *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2006;

Golzarian *et al.*, 2002; Jonker, Aruny et Muhs, 2009; Kasirajan *et al.*, 2003). Cette manifestation peut être transitoire et se résorber par elle-même, mais elle peut aussi devenir persistante dans certains cas et nécessiter une intervention (Buckenham *et al.*, 2009; Bush *et al.*, 2001; Jonker, Aruny et Muhs, 2009). L'endofuite de type II peut provenir d'une seule artère ou de plusieurs ; l'utilisation d'ultrason Doppler permet de s'assurer de l'origine(s) de la/les fuite(s) (Buckenham *et al.*, 2009).

En général, le taux d'incidence de ce type de fuite oscille entre 10 et 25 % des EVAR (Baum *et al.*, 2003). Dans les 30 premiers jours suivant l'intervention, jusqu'à 14 % des patients présenteront ce type d'endofuite considérée comme l'une des plus fréquentes avec celle de type I (Drury *et al.*, 2005; Stavropoulos *et al.*, 2005). Après 1 an, ce taux diminue à 10,2 % et produit une augmentation du sac anévrismal dans 55 % de ces cas (Jonker, Aruny et Muhs, 2009). Selon Conrad *et al.* (2009), les fuites de type II seraient la cause d'une ré-intervention dans une proportion de 38 % des cas (Conrad *et al.*, 2009).

Type III : Les fuites de type III proviennent du bris ou de la déconnexion d'un module de l'endoprothèse couverte causés par la corrosion et la dégradation du treillis métallique ou du recouvrement polymérique (Drury *et al.*, 2005; Kirby et Goodwin, 2003). Cet évènement est très dangereux pour le patient, car il augmente considérablement les chances de rupture du sac anévrismal.

Type IV : La fuite de type IV résulte de la porosité du tissu polymérique de l'endoprothèse et elle se résorbe d'elle-même (Drury *et al.*, 2005; Kirby et Goodwin, 2003).

Type V : Connue aussi sous le phénomène d'endotension, elle est caractérisée par la croissance de l'anévrisme en absence de fuite détectable (Drury *et al.*, 2005).

1.1.3.1 Interventions possibles

Lorsqu'une fuite se développe suite à une EVAR, le moyen de la traiter peut être variable. La ré-intervention peut se faire de façon endovasculaire (peu invasive) ou de façon chirurgicale. Le choix de l'opération pour corriger la complication dépendra beaucoup du type et de l'anatomie de la fuite ainsi que de l'état de santé du patient (Peynircioğlu *et al.*, 2008). Le praticien peut opter pour l'occlusion du sac anévrismal par un agent embolisant, la ligature d'artères, l'installation d'une extension, faire une opération de conversion (chirurgie) ou encore utiliser une solution hybride (Hiraki *et al.*, 2005). Dans le cas de fuite de type III, la seule intervention possible consiste à une opération de conversion.

Dans l'étude de Conrad *et al.* (2009), échelonnée entre 1999 et 2007 et regroupant 832 patients, un taux de ré-intervention après EVAR de 11 % (16,2 % selon Drury *et al.* (2005)) a été observé (Conrad *et al.*, 2009; Drury *et al.*, 2005). Après 5 ans, ce chiffre augmente à 20 % et le temps moyen pour une ré-intervention est de 17 mois (Conrad *et al.*, 2009; Grisafi *et al.*, 2010).

Opération de conversion

L'opération de conversion constitue la solution de dernier recours puisqu'elle est invasive. La technique consiste à enlever l'endoprothèse, suturer une prothèse vasculaire et faire une mise à plat de l'anévrisme. Dans 1,7 % des cas, cette opération est nécessaire immédiatement après l'EVAR due à une complication majeure (Drury *et al.*, 2005). Ce taux augmente à 2 % après 30 jours et serait d'environ 10 % après 3 ans (Drury *et al.*, 2005).

Installation d'extension

L'utilisation d'une extension traite spécifiquement les endofuites de type Ia ou Ib (Peynircioğlu *et al.*, 2008). L'extension consiste à installer par voie intraartérielle une section supplémentaire d'endoprothèse. Cette solution est limitée par l'espace disponible entre le collet de la prothèse déjà présente et les artères rénales, puisqu'il faut éviter de les obstruer.

Utilisation d'agent embolisant

L'embolisation du sac anévrismal ou des artères collatérales qui compromettent le succès de l'EVAR constitue une alternative intéressante pour les fuites de type I, II et V, car elle est peu invasive (Chao *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011; Grisafi *et al.*, 2010; Kasirajan *et al.*, 2003; Kirby et Goodwin, 2003; Ling *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2001; Peynircioğlu *et al.*, 2008; Rusius *et al.*, 2011; Stavropoulos *et al.*, 2005). Le concept consiste à utiliser un agent embolisant polymérique, biologique (thrombine) ou métallique (spirale en platine ou en acier inoxydable) pour occlure la fuite, voir le sac anévrismal au complet. Un point important qui permettrait d'obtenir de bons résultats à long terme serait l'embolisation complète des artères affluentes et effluentes du sac anévrismal ainsi que du sac en lui-même (Kasirajan *et al.*, 2003).

Bien que l'embolisation s'effectue généralement lorsqu'une endofuite a été décellée, plusieurs auteurs proposent de faire une embolisation préventive, avant ou durant l'EVAR (traitement prophylactique) (Jonker, Aruny et Muhs, 2009).

1.2 Les agents embolisant existants

L'utilisation d'agent embolisant dans le traitement des endofuites au niveau de l'aorte abdominale est une opération pratiquée de nos jours. La majorité des produits utilisés actuellement sont toutefois seulement approuvés pour les anévrismes intracrâniens ou les malformations artérioveineuses (*AVM*), mais non pour les AAA. Il est d'ailleurs surprenant qu'ils soient utilisés chez l'homme dans ce contexte, car les besoins sont très différents.

1.2.1 Critère pour un embolisant idéal pour les AAA

Tout d'abord, il faut spécifier que la recherche actuelle s'intéresse particulièrement à l'embolisation du sac anévrismal et des artères parentes puisque ce type d'intervention est susceptible d'obtenir de meilleurs résultats (Kasirajan *et al.*, 2003). Cependant, seule une

occlusion des artères parentes pourrait aussi être envisageable dans certains cas et produire un effet adéquat.

Il faut savoir que les AAA sont d'une échelle de grandeur nettement supérieure à celle des anévrismes intracrâniens, ce qui nécessite un volume d'agent embolisant beaucoup plus important dans l'éventualité d'une embolisation du sac anévrismal. Selon l'étude de Hahne *et al.* (2011), le diamètre moyen d'un AAA, 3 jours après une EVAR, étaient de $5,9 \text{ cm} \pm 1,5 \text{ cm}$ et d'un volume de $165 \text{ ml} \pm 93 \text{ ml}$ (68 patients) (Hahne *et al.*, 2011). Dans le cas d'anévrisme intracrânien, ils sont considérés comme géant lorsque son diamètre est supérieur à $2,5 \text{ cm}$ (Molyneux *et al.*, 2004). Dans l'étude de Barnett et Gailloud (2011), jusqu'à 325 ml d'EmboGel a été nécessaire pour emboliser un modèle *in vitro* d'AAA (Barnett et Gailloud, 2011). Cet aspect joue un rôle très important dans l'élaboration d'un agent embolisant pour les AAA.

L'objectif du traitement embolisant est d'obtenir une exclusion complète et stable du sac anévrismal avec une préservation des vaisseaux parents tout en évitant la migration de l'embolisant (Barnett et Gailloud, 2011; Barnett *et al.*, 2009). L'utilisation d'embolisant visqueux se gélifiant est une voie très intéressante pour accomplir cet objectif. Ils permettraient une embolisation plus efficace et homogène et réduiraient du même coup les chances de récurrences souvent observées avec l'utilisation de spirales métalliques (coils), considérée à ce jour comme le traitement standard (Barnett et Gailloud, 2011; Becker *et al.*, 2007; Molyneux *et al.*, 2004; Soga *et al.*, 2004). Les liquides embolisant auraient deux avantages sur les spirales : ils embolisent immédiatement et peuvent être délivrés plus aisément de façon distale (Soga *et al.*, 2004; Song, Won et Kim, 2010). De plus, ils sont généralement moins dispendieux (Kasirajan *et al.*, 2003).

Certaines caractéristiques sont recherchées pour assurer une efficacité accrue. Pour éviter l'embolisation non ciblée et l'embolisation incomplète, la viscosité, la radio-opacité et la vitesse de gélification de l'agent embolisant doivent assurer un contrôle et un suivi de l'injection (Lee *et al.*, 2009a). Tout en évitant de coller le cathéter aux tissus biologiques, le

gel doit être mucoadhésif et posséder de bonnes propriétés mécaniques afin de bloquer le passage du sang et de permettre un temps de résidence prolongé (Kuo et Ma, 2001; Lee *et al.*, 2009a). Un faible potentiel toxique, un délai procédural court et une bonne biocompatibilité sous forme de gel réduiraient les risques de réactions immunitaires et de morbidités (Becker *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009a). Selon Becker *et al.* (2007), un embolissant qui se dégrade et favorise la formation d'un tissu fibreux créant une barrière biologique contre le rétablissement de la circulation sanguine intrasac assurerait une meilleure guérison du patient (Becker *et al.*, 2007). Un faible coût du dispositif peut aussi être considéré comme important (Greben *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009a).

Actuellement, plusieurs gammes de polymères (ex. : acrylate, gélatine, poly(éthylène et alcool vinylique), alginat...) sont étudiées ou même déjà utilisées pour l'embolisation. Ils possèdent des avantages, mais aussi des inconvénients qui limitent leur utilisation dans les AAA. Les principaux problèmes reliés à ces agents sont la migration, la non-oblitération du sac anévrismal, l'occlusion immédiate ou à retardement des vaisseaux parents, l'utilisation de solvant organique pour la solubilisation du polymère et la rétention du cathéter sur la paroi aortique (Barnett et Gailloud, 2011; Greben *et al.*, 2009; Kasirajan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Les différents agents embolisant actuels sont détaillés ci-après.

1.2.2 Les spirales métalliques (coils)

Les spirales métalliques constituent le standard dans l'embolisation d'anévrismes sacculaires intracrâniens, mais sont aussi testées au niveau des AAA de façon expérimentale (Barnett et Gailloud, 2011; Chao *et al.*, 2006; Golzarian *et al.*, 2002; Hiraki *et al.*, 2005; Kasirajan *et al.*, 2003; Peynircioğlu *et al.*, 2008; Soga *et al.*, 2004; Stavropoulos *et al.*, 2005). Les spirales peuvent être fabriquées en acier inoxydable, en platine ou encore en alliages à mémoire de forme (Becker, Kipke et Brakora, 2003; Bush *et al.*, 2001; Golzarian *et al.*, 2002; Peynircioğlu *et al.*, 2008; Stavropoulos *et al.*, 2005).

Une des conclusions qui ressort des différentes études est un taux de récurrence élevé des fuites dans le cas de gros et de géant anévrismes (Becker *et al.*, 2007; Soga *et al.*, 2004). L'implantation de spirales métalliques est difficile à contrôler : les spirales peuvent s'emmêler ou dépasser dans les vaisseaux sanguins parents augmentant les chances de caillots sanguins (Becker, Kipke et Brakora, 2003; Becker *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2006; Greben *et al.*, 2009; Kasirajan *et al.*, 2003). De plus, ce type de dispositif ne permet pas d'oblitérer complètement le sac anévrismal (entre 30 et 40 % du volume de l'anévrisme), le reste étant rempli par un thrombus possédant des propriétés mécaniques faibles (Barnett et Gailloud, 2011; Becker, Kipke et Brakora, 2003; Becker *et al.*, 2007; Hiraki *et al.*, 2005; Soga *et al.*, 2004). Ils produisent des artefacts importants qui compliquent le suivi radiologique (Becker *et al.*, 2007; Bush *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2006; Golzarian *et al.*, 2002; Greben *et al.*, 2009; Kasirajan *et al.*, 2003). À long terme, l'érosion des spirales métalliques peut causer des complications (Greben *et al.*, 2009).

Afin d'améliorer leur efficacité, plusieurs recherches ont été accomplies pour développer des spirales 3D, sphériques, bioadhésives ou recouvertes d'hydrogel expansible, mais le taux de non-oblitération et de récurrence restait tout de même élevé (Becker *et al.*, 2007; Greben *et al.*, 2009; Hiraki *et al.*, 2005; Loch Macdonald *et al.*, 1998; Soga *et al.*, 2004). La possibilité de remplir complètement l'anévrisme avec des spirales est physiquement impossible malgré les améliorations apportées à ce type de dispositif (Soga *et al.*, 2004).

1.2.3 Poly(éthylène et alcool vinylique)

1.2.3.1 Onyx[®]

L'Onyx[®] (ev3, Irvine, CA) est un agent emboliant composé de poly(éthylène et alcool vinylique) (EVOH) dissout dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Ling *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2001; Quireshi, 2011; van Rooij, Sluzewski et Beute, 2007). Il existe quatre formulations différentes, soit l'Onyx[®] 18, l'Onyx[®] 20, l'Onyx[®] 34 et l'Onyx[®] HD 500 avec des concentrations en EVOH entre 6 et 20 % (Ayad, Eskioglu et Mericle, 2006; Quireshi, 2011;

van Rooij, Sluzewski et Beute, 2007). Les trois premiers produits sont approuvés pour l'embolisation d'AVM, tandis que le dernier pour les anévrismes intracrâniens (Grisafi *et al.*, 2010; Loh et Duckwiler, 2010; Quireshi, 2011; Seron *et al.*, 2009; van Rooij, Sluzewski et Beute, 2007). L'ajout de metrizamide (AdC non ionique) ou de tantalum micronisé permet de rendre la solution radio-opaque et de faire un suivi de l'injection par imagerie (Ling *et al.*, 2007; Loh et Duckwiler, 2010; Martin *et al.*, 2001; Seron *et al.*, 2009).

La précipitation du produit Onyx® se fait par échange de solvant. L'EVOH est un polymère insoluble dans l'eau ou dans le plasma sanguin. Une fois injecté dans la région désirée, le DMSO, miscible dans l'eau, sort de la solution et déclenche la précipitation de l'EVOH (Loh et Duckwiler, 2010; Quireshi, 2011). Il en résulte un bouchon polymérique spongieux, mou, non adhérent aux parois vasculaires avec un centre semi-liquide à court terme (Ling *et al.*, 2007; Loh et Duckwiler, 2010; Quireshi, 2011).

Bien qu'il soit fréquemment utilisé dans le domaine intracrânien, son utilisation au niveau de l'aorte abdominale peut être problématique. Tout d'abord, l'utilisation de cathéter résistant au DMSO est nécessaire (Loffroy et Steinmetz, 2011; Loh et Duckwiler, 2010; Martin *et al.*, 2001; Seron *et al.*, 2009). Ensuite, le DMSO est un produit pouvant produire une toxicité locale ou systémique (Barnett et Gailloud, 2011; Becker *et al.*, 2005; Seron *et al.*, 2009). La procédure d'injection peut être longue due aux contraintes reliées à la vitesse d'injection et au volume injectable (Loffroy et Steinmetz, 2011; Loh et Duckwiler, 2010; Martin *et al.*, 2001). L'injection doit être lente (0,10 ml/min) pour s'assurer qu'il n'y ait pas une forte dose instantanée de DMSO relarguée dans le sang, ce qui pourrait causer des vasospasmes (Becker *et al.*, 2007; Grisafi *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2007; Loffroy et Steinmetz, 2011; Loh et Duckwiler, 2010; Seron *et al.*, 2009). Le volume injectable est limité en termes de volume par injection (0,2 ml) obligeant le praticien à faire l'embolisation par étape (Loffroy et Steinmetz, 2011). Entre chaque injection, le ballonnet retenant le polymère en place doit être dégonflé afin de permettre la perfusion de l'artère et la solidification du polymère, ce qui augmente les risques de migration et d'embolisation d'artères parentes (Becker *et al.*, 2007). Le volume total injecté est aussi limité afin de ne pas causer de toxicité (Loh et Duckwiler,

2010). L'AdC restant emprisonné dans le polymère, le suivi post embolisation reste compliqué en radiologie due aux artéfacts qu'il produit (Grisafi *et al.*, 2010; Loh et Duckwiler, 2010; Martin *et al.*, 2001). Finalement, puisque la solution d'Onyx® est composée majoritairement de DMSO, il y a une grande perte de masse entre le volume injecté et ce qui est effectif comme embolie (Seron *et al.*, 2009). Ceci est d'autant plus problématique que le coût de l'Onyx® est prohibitif (Loffroy et Steinmetz, 2011)

L'Onyx® a quand même été testé dans l'anévrisme de l'aorte abdominale, mais plus spécifiquement étudié et documenté pour traiter les fuites de type II et l'embolisation des artères collatérales et non pour celle du sac anévrismal (Grisafi *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2001; Peynircioğlu *et al.*, 2008).

1.2.4 Les acrylates

1.2.4.1 Histoacryl® et TruFill®

Les acrylates, plus particulièrement le *N*-butyl-2-cyanoacrylate (NBCA), sont utilisés depuis longtemps pour occlure les AVM (Seron *et al.*, 2009). Les produits commerciaux existants, dont l'Histoacryl® (B.Braun Medical inc.) et le TruFill® Liquide Embolic System (Cordis Neurovascular inc.), sont d'ailleurs approuvés à cette fin par la FDA (Loh et Duckwiler, 2010; Song, Won et Kim, 2010; Stavropoulos *et al.*, 2005). L'Histoacryl®, étant très adhérent aux tissus biologiques (Choi *et al.*, 2011; Kirby et Goodwin, 2003), il est aussi employé comme colle tissulaire et pour la sclérothérapie (B. Braun Medical inc.).

Les produits dérivés des acrylates, comme le NBCA ou l'isobutyl cyanoacrylate (ISCA), durcissent par polymérisation et ne sont pas des hydrogels (Loh et Duckwiler, 2010; Peynircioğlu *et al.*, 2008). Dans le cas du NBCA et du ISCA cette polymérisation se produit lorsqu'ils sont mis en contact avec une solution ionique (Becker *et al.*, 2005), par exemple l'eau et les protéines présentes dans le sang (Oowaki *et al.*, 2000). Cette polymérisation est très rapide (entre 0,1 et 8 s (Kirby et Goodwin, 2003; Oowaki *et al.*, 2000)), mais peut être

ralentie par l'ajout de lipiodol, un produit radio-opaque hydrophobe (Chao *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011; Oowaki *et al.*, 2000; Song, Won et Kim, 2010; Stavropoulos *et al.*, 2005). L'utilisation de tantale a déjà été testée, mais la production d'artéfact lors du suivi radiologique était trop importante (Chao *et al.*, 2006).

Quoiqu'approuvées par la FDA pour l'embolisation des AVM, les solutions d'acrylate commercialisées possèdent beaucoup d'inconvénients pour leur utilisation dans les AAA. Tout d'abord, ils durcissent beaucoup trop rapidement, ce qui engendre un manque de contrôle lors de l'embolisation (Barnett et Gailloud, 2011; Loh et Duckwiler, 2010; Song, Won et Kim, 2010). Les risques de coller le cathéter au vaisseau et de l'endommager ou de relâcher des morceaux de polymère dans la circulation sanguine lors du retrait du cathéter sont importants (Becker *et al.*, 2005; Buckenham *et al.*, 2009; Loh et Duckwiler, 2010). Le chirurgien pratiquant une opération d'embolisation avec ces produits doit être très expérimenté (Becker *et al.*, 2005; Loh et Duckwiler, 2010; Oowaki *et al.*, 2000; Peynircioğlu *et al.*, 2008; Seron *et al.*, 2009). Avant l'injection, le cathéter doit être nettoyé avec une solution de dextran 5 % pour éviter qu'il n'y ait une polymérisation dans le cathéter (Song, Won et Kim, 2010).

L'embolisation non ciblée constitue une autre difficulté rencontrée avec l'utilisation du NBCA (Song, Won et Kim, 2010). Afin de prévenir l'embolisation non ciblée, l'utilisation combinée de spirales métalliques et de NBCA est couramment utilisée. Le NBCA ayant une faible viscosité avant sa polymérisation (entre 3.2 et 7.4 cP (Oowaki *et al.*, 2000)), les spirales sont utilisées dans des anévrismes à débit important, comme les AAA, ou dans les vaisseaux tortueux pour éviter la migration du produit lors de l'injection (Chao *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011; Peynircioğlu *et al.*, 2008; Song, Won et Kim, 2010; Stavropoulos *et al.*, 2005).

L'embolisation de gros volumes doit se faire par étape (Peynircioğlu *et al.*, 2008) et nécessite une re-cathéterisation et l'utilisation d'un nouveau cathéter entre chaque étape, allongeant considérablement le temps d'opération (Becker *et al.*, 2005). La cytotoxicité du produit

constitue toujours une source de préoccupation chez les spécialistes : il causerait de fortes réactions inflammatoires chez certains patients (Barnett *et al.*, 2009; Natarajan *et al.*, 2009; Oowaki *et al.*, 2000). Cette réaction peut être attribuable à la formation de formaldéhyde par hydrolyse (Oowaki *et al.*, 2000), mais aussi à la réaction exothermique de la polymérisation (Loh et Duckwiler, 2010). Enfin, le suivi postopératoire est plus compliqué, car le lipiodol garde l’embolie hautement radio-opaque et peut produire des artéfacts (Choi *et al.*, 2011; Kirby et Goodwin, 2003).

Bien que le NBCA soit approuvé par la FDA pour le traitement des AVM, il n’y a pas beaucoup d’enthousiasme quant à son utilisation dans le système vasculaire périphérique (Song, Won et Kim, 2010).

1.2.4.2 L’Ultragel

En cours de développement, l’Ultragel (Poly(éthylène-glycol)-diacrylate), se polymérise par photoluminescence (Barnett *et al.*, 2009). Un photoinitiateur est utilisé *in situ* pour produire des radicaux libres qui réagissent avec les groupements terminaux du polymère et produisent la réticulation de ce dernier (Barnett *et al.*, 2009). Cette technologie est toutefois peu développée dans le domaine de l’embolisation d’AVM, d’anévrisme intracrânien ou d’AAA.

Une seule étude produite par Barnett *et al.* (2009) a testé ce produit sur un modèle *in vitro* d’AAA pour évaluer son potentiel comme agent embolisant après une EVAR ; il n’y a pas eu de suite jusqu’à maintenant.

1.2.5 L’alginat de calcium

L’alginat est un polysaccharide naturel extrait principalement d’algue marine (Becker *et al.*, 2005; 2007; Soga *et al.*, 2004). Il est composé de blocs d’acide mannuronique et guluronique (*voir* Figure 1.5A) dans des arrangements et poids moléculaires variés lui conférant des

propriétés biologiques et mécaniques diverses (Becker, Kipke et Brakora, 2003; Becker *et al.*, 2005; 2007; Lee *et al.*, 2009a).

Le mode de formation des hydrogels d'alginate se produit par interaction ionique. C'est la partie guluronique qui permet l'interaction d'ions mono- ou divalent de sodium ou de calcium (voir Figure 1.5B) (Becker, Kipke et Brakora, 2003; Becker *et al.*, 2005; 2007). En solution, la partie guluronique est liée avec des ions sodiums. Lorsque la solution est exposée à une forte concentration en calcium, le calcium remplace le sodium et déclenche la réticulation de l'alginate pour former un hydrogel (Becker, Kipke et Brakora, 2003). Sa solubilité, la faible concentration nécessaire pour produire un gel (environ 2 %) et sa forte concentration en eau lui confère des propriétés biocompatible et non toxique (Becker *et al.*, 2005). Ayant été utilisé pendant la 2^e guerre mondiale dans les domaines de l'alimentation et médical, il est approuvé par la FDA comme GRAS (generally regarded as safe) dans le domaine alimentaire (Barnett *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2005).

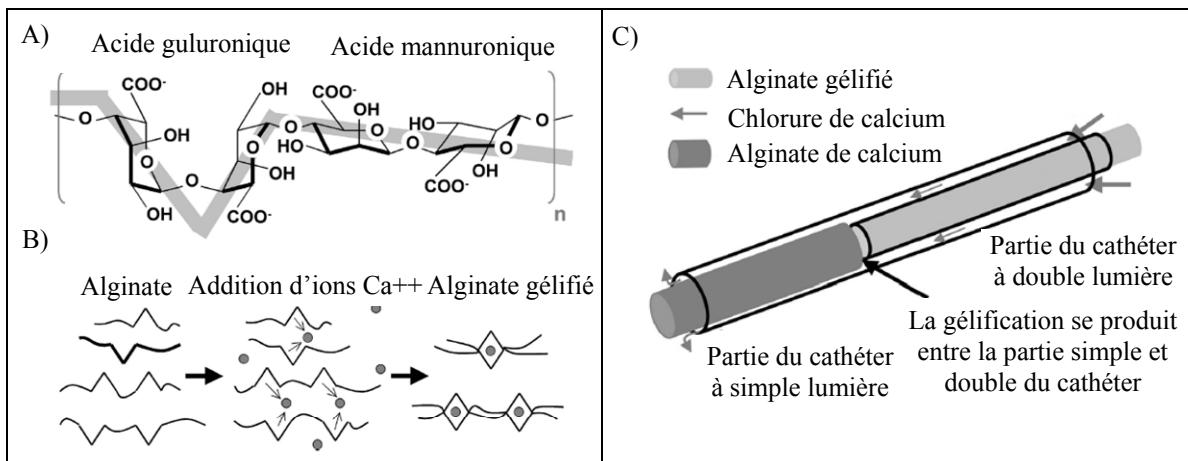


Figure 1.5 A) molécule d'alginate, B) principe de formation du gel d'alginate et C) technique de gélification par cathéter à double lumière pour l'injection
Adaptées de Becker *et al.* (2005) et Soga *et al.* (2004)

Le gel d'alginate a surtout été étudié *in vivo* sur des modèles animaux pour l'embolisation des anévrismes intracrâniens et les AVM (Becker, Kipke et Brandon, 2001; Becker *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2005; 2007; Lee *et al.*, 2009a; Raymond *et al.*, 2003). Dernièrement, il a

été testé *in vitro* pour occlure un modèle de sac anévrismal de l'aorte (Barnett et Gailloud, 2011; Barnett *et al.*, 2009). Il existe actuellement deux noms commerciaux de produit destinés à l'embolisation toujours à l'étude, soit l'EmboGel et le GORE Embolic Liquid (Gore Medical Products Division).

Les chercheurs utilisent généralement la technique du cathéter à doubles lumières (*voir* Figure 1.5C) pour emboliser les anévrismes ou les AVM (Becker, Kipke et Brandon, 2001; Becker *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2003). Cette technique s'est avérée plus efficace en permettant un meilleur contrôle lors de l'injection. Cependant, elle a comme conséquence de limiter la viscosité de l'alginate utilisable pour l'injection et les risques de migration ou d'embolisation non ciblée restent tout de même importants (Barnett *et al.*, 2009; Raymond *et al.*, 2003). La faiblesse mécanique (Lee *et al.*, 2009a; Raymond *et al.*, 2003) et la structure non uniforme du gel obtenu par une exposition inadéquate à l'activateur (Kuo et Ma, 2001; Molyneux *et al.*, 2004), le faible remplissage de l'anévrisme (entre 69,2 et 84,6 % (Soga *et al.*, 2004)) et le manque d'adhésion de l'alginate sur les parois vasculaires (Becker *et al.*, 2005; 2007; Lee *et al.*, 2009a; Raymond *et al.*, 2003) augmentent les risques d'embolisation non ciblée. Le retrait du cathéter peut aussi poser problème puisqu'une partie du gel est gélifié dans la partie terminale du cathéter et l'embolie peut alors être propulsée dans le réseau vasculaire lors du retrait (Raymond *et al.*, 2003).

L'hydrogel d'alginate présente beaucoup de caractéristiques intéressantes pour son utilisation dans le traitement des endofuites après EVAR, mais possède tout de même certains inconvénients non négligeables. La viscosité injectable limitée due à la technique du cathéter à double lumière employée, les risques d'embolisation non ciblée, le manque d'homogénéité du gel et le manque d'adhésion sur la paroi aortique constituent ces principaux défauts.

1.2.6 Autres

Il existe des agents embolisant sous forme d'éponge thrombogéniques de gélatine ou de microsphère d'alcool polyvinyle (PVA) (Marques commerciales : Embospheres (PVA),

Spongostan (gélatine), Gelfoam (gélatine), Gelitaspon (gélatine) (Abada et Golzarian, 2007; Hahn *et al.*, 2010).

Étant sous forme de poudre ou de microsphère (Hahn *et al.*, 2010), ces agents embolisant ne sont pas utilisés pour les gros anévrismes à cause des grands risques de migration, d'embolisation non ciblée et de recanalisation (Abada et Golzarian, 2007; Bush *et al.*, 2001). De plus, les éponges de gélatine sont des agents temporaires (résorbable rapidement) et sont plutôt utilisées pour arrêter un saignement ou dévasculariser une lésion avant une opération (Abada et Golzarian, 2007).

1.3 Les hydrogels

Au cours des 10 dernières années, un intérêt particulier pour une nouvelle classe de produits médicaux a fait son apparition. Les gels et les hydrogels sont le centre de plusieurs recherches pour leur utilisation dans divers domaines de la santé et semblent prometteurs (Xie *et al.*, 2010). Majoritairement des polymères, ils sont étudiés tant pour l'ingénierie tissulaire (Ruel-Gariépy et Leroux, 2004) que le génie génétique (Hamidine et Heuzey, 2009). Les hydrogels constituent une voie prometteuse pour l'embolisation des AAA, car ils peuvent être composés d'une faible concentration en polymère, ce qui permet une meilleure biocompatibilité.

1.3.1 Définition des gels et hydrogels

Trouver une définition pour « gel » est une activité complexe et fait appel à des notions un peu arbitraires. Cette difficulté provient de la nature de ce type de matériau, mais aussi du fait qu'il est employé et a été défini différemment dans plusieurs domaines d'activités tels la physique, la chimie, la biologie et l'ingénierie chimique (Almdal *et al.*, 1993). Les premiers auteurs qui ont tenté de définir la signification du mot « gel » se sont butés à la mince différence qui peut exister entre un gel et un solide, mais aussi entre un gel et un produit

caillebotté, figé ou coagulé (Loyd, 1926). Les gels sont plutôt une phase intermédiaire entre le liquide et le solide pouvant être composés d'éléments organiques ou inorganiques.

Suite à la lecture de plusieurs articles, deux éléments reviennent fréquemment lorsqu'il est question de gel :

- 1) les gels sont des matériaux mous ou semi-solides composés d'au moins une phase solide et une phase liquide (Almdal *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2004a; Hamdine et Heuzey, 2009; Loyd, 1926) ;
- 2) lorsqu'évalués de façon dynamique, ils possèdent un module de conservation (G') stable sur une période de quelques secondes, et un module de perte (G'') nettement inférieure, dans l'intervalle de ce plateau (*voir* Figure 1.6) (Almdal *et al.*, 1993; Hamdine et Heuzey, 2009).

Le côté arbitraire de la définition d'un gel se rattache à l'interprétation de ce dernier critère. À quel moment le module de conservation (G') est-il suffisamment supérieur au module de perte (G'') pour être considéré comme étant un gel ? De façon générale, cette notion implique que les gels exhibent un comportement élastique, c'est-à-dire qu'ils reprennent leur forme initiale suite à une sollicitation ponctuelle. Les liquides viscoélastiques sont exclus de la catégorie des gels puisqu'ils ne présentent pas, de façon macroscopique, de comportements élastiques.

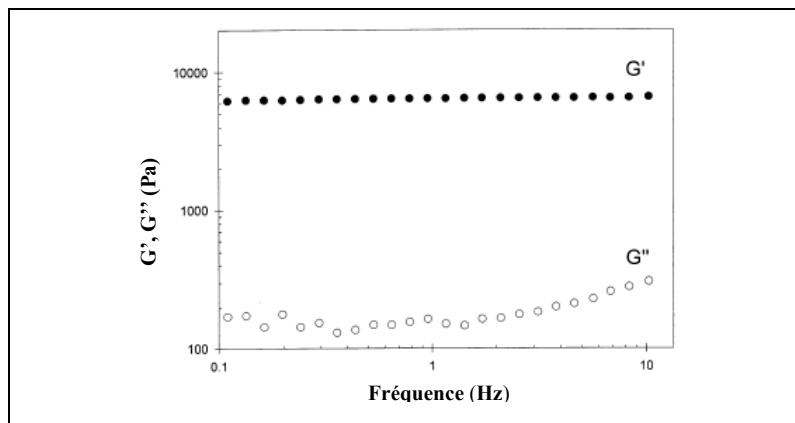


Figure 1.6 Dépendance des modules G' et G'' en fonction de la fréquence d'un gel de chitosane 2 %
Adaptée de Chenite *et al.* (2001)

Les hydrogels sont des gels dans lesquels l'eau constitue la phase liquide. Pour conserver l'eau à l'intérieur d'une structure polymérique, le réseau doit nécessairement être hydrophile (Berger *et al.*, 2004b). Il peut y avoir différents phénomènes, de force variable, permettant la rétention d'eau dans la structure tridimensionnelle. Par exemple, dans les gels de gélatine, il y aurait de l'eau liée par sorption à des centres à haute énergie, des couches monomoléculaires et polymoléculaires structurées au réseau polymérique ainsi que de l'eau libre (Kalyanam, Yapp et Insana, 2009). Le ratio de ces différentes liaisons a une influence sur les propriétés mécaniques du gel obtenu.

1.3.2 Utilisation dans le domaine médical

Les hydrogels sont beaucoup utilisés dans le domaine médical. Ils peuvent être employés pour le transport de médicament, l'encapsulation de cellule et la réparation tissulaire (Ruel-Gariépy et Leroux, 2004). Leur utilisation est favorisée par le mode d'administration peu invasif, les propriétés biologiques qu'ils démontrent, la capacité de certains à se résorber *in vivo*, la possibilité d'incorporer des ingrédients actifs par simple mélange et leur habileté à remplir uniformément des formes complexes.

L'élément qui rend certains hydrogels intéressants dans le domaine médical consiste à la possibilité de les retrouver sous forme liquide lorsqu'*ex vivo*, de les injecter dans le corps humain de façon peu invasive et qu'ils soient capable de former un corps cohésif *in vivo*. Lors de l'injection, la solution pénètre aisément dans le tissu ou l'organe désiré et se solidifie pour assurer une pérennité prolongée et empêcher sa migration (Ruel-Gariépy et Leroux, 2004). Les hydrogels sont composés de réseaux polymériques hautement hydrophiles et ont une forte concentration en eau (Barnett *et al.*, 2009). La faible teneur en polymère assure une meilleure biocompatibilité et offre des propriétés biologiques très intéressantes. La plupart sont formés à partir de polymères extraits ou produits à partir d'organisme vivant, tels les algues (alginate), les fibres végétales (cellulose), les tissus humains (acide hyaluronique, collagène), les crustacés (chitosane), et sont donc naturels.

1.3.3 Mode de formation des hydrogels

Il existe plusieurs processus menant à la gélification d'une solution polymérique. Ces processus sont regroupés en différentes classes selon s'ils sont d'ordre chimique ou physique, réversible ou non (Berger *et al.*, 2004a; Hamdine et Heuzey, 2009; Ruel-Gariépy et Leroux, 2004). Les gels chimiques, résultant de liaisons covalentes, sont irréversibles, tandis que les gels physiques ou formés par réticulation ionique sont pour la majorité réversibles (Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b; Hamdine et Heuzey, 2009). Les gels résultants de liaisons covalentes possèdent de meilleures caractéristiques mécaniques comparativement aux gels physiques. Entre les deux extrêmes, un mélange de liaisons covalentes, ioniques et physiques mène à la formation d'hydrogels intermédiaires (Berger *et al.*, 2004b).

1.3.3.1 Concentration en polymère

Les gels physiques peuvent être le résultat d'une concentration en polymère trop élevée dans une solution. Dans ces circonstances, les enchevêtrements et la friction entre les chaînes polymériques sont tellement denses que la mouvance des molécules les unes par rapport aux autres devient limitée. Leur utilisation dans le domaine médical est toutefois très restreinte,

car ce type de gel est très sensible à la dissolution et ils possèdent des caractéristiques mécaniques faibles.

1.3.3.2 Réticulation ionique

Il existe plusieurs façons de produire des gels en faisant appel aux interactions ioniques. Les liaisons ioniques (*voir* Figure 1.7A), les complexes polyélectrolytes (*voir* Figure 1.7B), l'échange de solvant et la modulation du pH ou de la température constituent les principales méthodes menant à la formation de ce type d'hydrogel. Dans tous les cas, ce sont les interactions secondaires qui sont en jeu (pont hydrogène, force de Van der Waals, attraction électrostatique et force hydrophobique), ce qui explique les propriétés mécaniques plus faibles et la réversibilité de la plupart de ces gels (Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b). Les caractéristiques mécaniques découlant de ce type de liaisons dépendent énormément de la densité de réticulation, elle-même dépendante de plusieurs facteurs comme le pH, la température, la force ionique, la masse moléculaire des polymères, l'ordre de mélange de la solution, etc (Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b). L'avantage majeur avec ce type de réticulation réside dans l'absence d'agent de réticulation, ce qui favorise la biocompatibilité (Berger *et al.*, 2004a). Les hydrogels de chitosane, qui font l'objet de cette maîtrise et seront détaillés dans la section 1.4, entrent dans cette catégorie de gel.

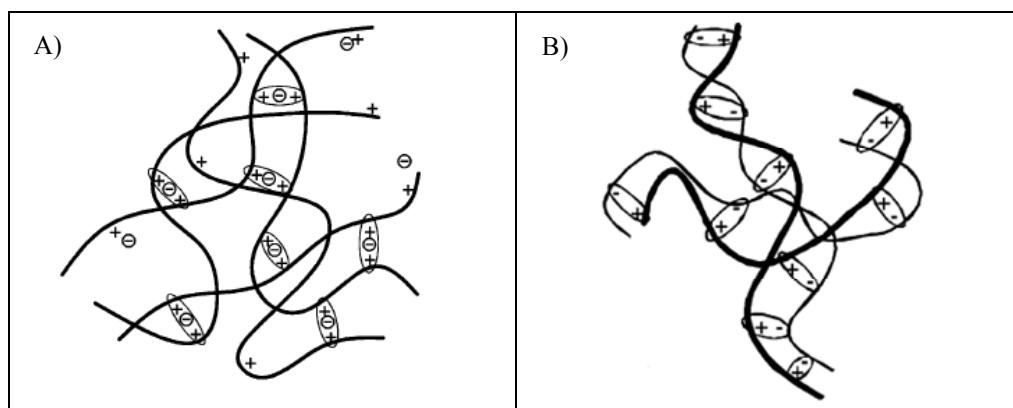


Figure 1.7 Structure d'un hydrogel formé par A) des interactions ioniques et B) un complexe polyélectrolyte
Adaptée de Berger *et al.* (2004b)

1.3.3.3 Réticulation covalente

La réticulation covalente peut se faire de deux façons, soit par l'utilisation d'un agent de réticulation chimique ou par photopolymérisation. La liaison covalente est forte en énergie, ce qui permet de produire des gels irréversibles qui possèdent des propriétés mécaniques élevées. En plus des critères énumérés pour la réticulation ionique, la densité de réticulation covalente dépend aussi de l'agent de réticulation utilisé pour produire la réaction. Il y a trois formes de réticulation observables avec la réticulation covalente : la réticulation entre le polymère lui-même (*voir* Figure 1.8A), la création d'un réseau polymérique hybride (HPN) (*voir* Figure 1.8B) ou d'un réseau semi ou complètement interpénétrant (RPI) (*voir* Figure 1.8C). Les propriétés du gel sont tributaires de la forme de réticulation ainsi que des molécules utilisées pour produire la réticulation. L'inconvénient majeur avec ce type de réticulation réside dans le potentiel toxique de l'agent de réticulation. Il est très difficile de purifier complètement le produit et la trace d'agent de réticulation n'ayant pas réagi peut engendrer de la toxicité cellulaire.

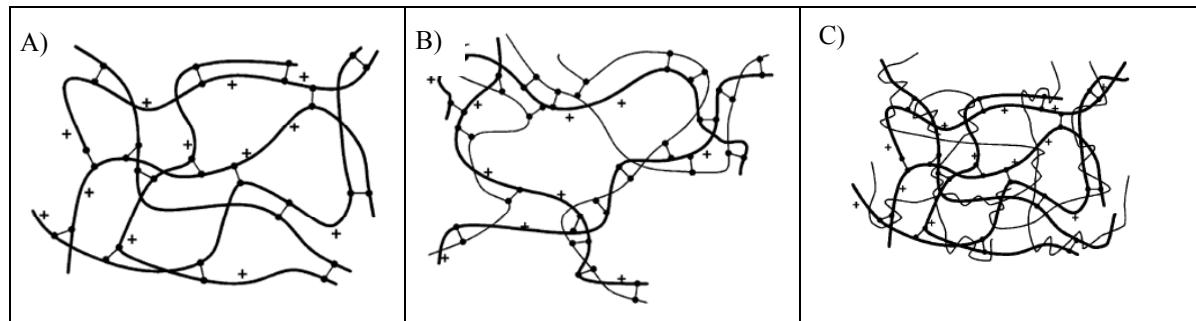


Figure 1.8 Différentes structures d'hydrogel formé par réticulation covalente A) un polymère réticulé avec lui-même B) un réseau polymérique hybride (HPN) et C) un réseau polymérique hybride interpénétrant (RPI)
Tirée de Berger *et al.* (2004b)

1.3.4 Caractérisation des hydrogels

La caractérisation des hydrogels dans le domaine médical se fait sous différents aspects. Les points intéressants se regroupent sous trois catégories, soit la résistance mécanique, le

comportement physicochimique/morphologique et les propriétés biologiques. Chacune de ces catégories apporte des éléments essentiels dans le développement d'un dispositif médical tel un agent embolisant.

1.3.4.1 Caractérisation mécanique

Sous forme liquide : Sous forme liquide, les hydrogels sont caractérisés principalement par leurs propriétés viscoélastiques, c'est-à-dire la viscosité complexe (η^*), les modules de conservation (G') et de perte (G'') :

- la **viscosité complexe (η^*)** représente la résistance à l'écoulement de la solution, lorsqu'évaluée de façon dynamique ;
- le **module de conservation (G')** représente la composante élastique en cisaillement et représente la portion réversible de la déformation suite à une sollicitation. Cet élément est représenté par le ressort dans la schématisation de la viscoélasticité à la Figure 1.9 (Haddad, 1995) ;
- le **module de perte (G'')** représente la composante visqueuse en cisaillement de la solution et constitue la portion irréversible de la déformation suite à une sollicitation. Cet élément est représenté par l'amortisseur dans la schématisation de la viscoélasticité à la Figure 1.9 (Haddad, 1995).

L'implication des modules G' et G'' est très importante dans la notion d'hydrogel gélifiant. Dans la situation où $G' < G''$, le système possède des propriétés viscoélastiques attribuables aux liquides (Cho *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006a). Lors de la gélification, le module G' évolue de façon à dépasser le module G'' et le matériau présente alors des propriétés élastiques plus près des solides. C'est l'évolution de ces deux modules qui permet de caractériser la cinétique de gélification des gels. La rhéométrie est principalement utilisée pour parvenir à déterminer ces paramètres.

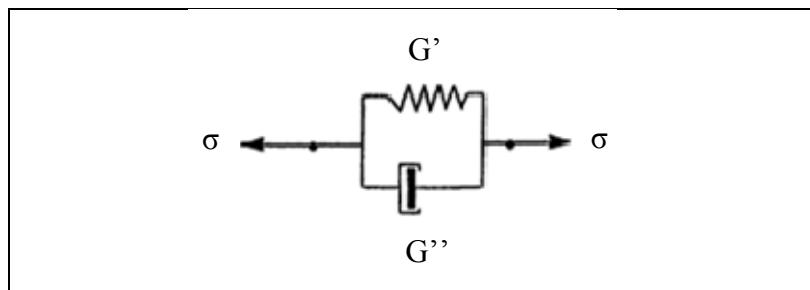


Figure 1.9 La viscoélasticité représentée par un système ressort/amortisseur selon le modèle de Kelvin
Adaptée de Haddad (1995)

Sous forme de gel : Sous forme de gel, il est très difficile de définir les caractéristiques intrinsèques. Puisque les hydrogels sont composés de deux phases, les tests utilisés pour les polymères et les solides ne représentent pas parfaitement la réalité. Dans l'hydrogel, la phase liquide peut se déplacer à l'intérieur du réseau polymérique et introduire de nouvelles composantes dans la notion de résistance mécanique. Les résultats, en plus de varier en fonction de la vitesse de sollicitation, des dimensions de l'échantillon, de la température et de la déformation appliquée, peuvent être influencés par la tonicité de la phase liquide (pression osmotique et gradient de diffusion), la friction entre les molécules libres présentes dans la phase liquide, la grosseur des pores du réseau polymérique, etc (Ho, Lowman et Marcolongo, 2006; Stammen *et al.*, 2001). Pour cette raison, la plupart des recherches qui se concentrent sur les propriétés intrinsèques élaborent des modèles mathématiques spécifiques à leur besoin. À titre d'exemple, Sergerie *et al.* (2009) ont utilisé une version modifiée du modèle poroélastique biphasique linéaire pour la caractérisation du plateau de croissance d'un os chez le porc tandis que Soulhat *et al.* (1999) ont opté pour le modèle isotropique biphasique homogène renforcé par de la fibrine pour la caractérisation du cartilage (Sergerie *et al.*, 2009; Soulhat, Buschmann et Shirazi-Adl, 1999). Pour cette raison, la plupart utilisent des tests simples en tension, compression, torsion ou en flexion avec des paramètres (vitesse et fréquence de sollicitation, dimension d'échantillon, etc) qu'ils établissent eux-mêmes en fonction de leurs besoins et de la revue de littérature qu'ils ont consultée (Stammen *et al.*, 2001). De ces tests, ils en ressortent des caractéristiques comme le module sécant en

compression, la rigidité, la dureté, la cohésion, etc qu'ils utilisent surtout à titre comparatif puisque ce ne sont pas des caractéristiques intrinsèques (Hamdine et Heuzey, 2009).

1.3.4.2 Caractérisation physicochimique et morphologique

À l'état de gel, il existe plusieurs autres façons de caractériser les hydrogels. Ces tests peuvent viser à définir la morphologie du réseau polymérique, le taux de gonflement, le rendement de la gélification ou la création et la force de liaison menant à la gélification. La morphologie peut être étudiée par microscopie à balayage (MEB) ou grâce à un microscope confocal à balayage laser (MCBL) (Hamdine et Heuzey, 2009). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ou la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) permettent pour leur part d'identifier les liaisons produites entre les différentes molécules. Les méthodes utilisées dans le cadre de ce projet sont détaillées au chapitre II.

1.4 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide naturel obtenu par la désacétylation de la chitine, un produit présent dans la carapace de certains crustacés (Chenite *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2006a; Lavertu, 2007). Il est étudié dans diverses applications tant dans le domaine pharmaceutique (libération lente de médicament), médical (régénération articulaire, guérison des plaies, membrane d'hémodialyse, support pour réparation nerveuse, etc), alimentaire (préservation de fruit et immobilisation d'enzyme dans le processus industriel d'aliments), qu'environnemental (sorption de métal lourd) (Rinaudo, 2008). L'idée d'utiliser le chitosane comme agent embolisant découle du fait qu'il peut former des gels thermogélifiants (Chenite *et al.*, 2000).

1.4.1 La structure chimique

Le chitosane est un polymère formé de sucres D-glucosamine et N-acétyle-D-glucosamine (voir Figure 1.10) (Cho *et al.*, 2006a; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Il présente des groupes fonctionnels acétyles et amines. Pour obtenir le chitosane, la chitine, l'élément de base, est désacétylée en partie ou en totalité (Rinaudo, 2008); ses groupements fonctionnels acétyles (-COCH₃) sont remplacés, grâce à un procédé chimique ou enzymatique, par un atome hydrogène pour former des groupements amines primaires (-NH₂). La masse moléculaire (M_w), le degré de désacétylation (DDA) et la polydispersité des chaînes sont trois caractéristiques importantes ayant une influence majeure sur les propriétés physicochimiques, mécaniques et biologiques de la molécule (Berger *et al.*, 2004a; Chenite *et al.*, 2000; Rinaudo, 2008).

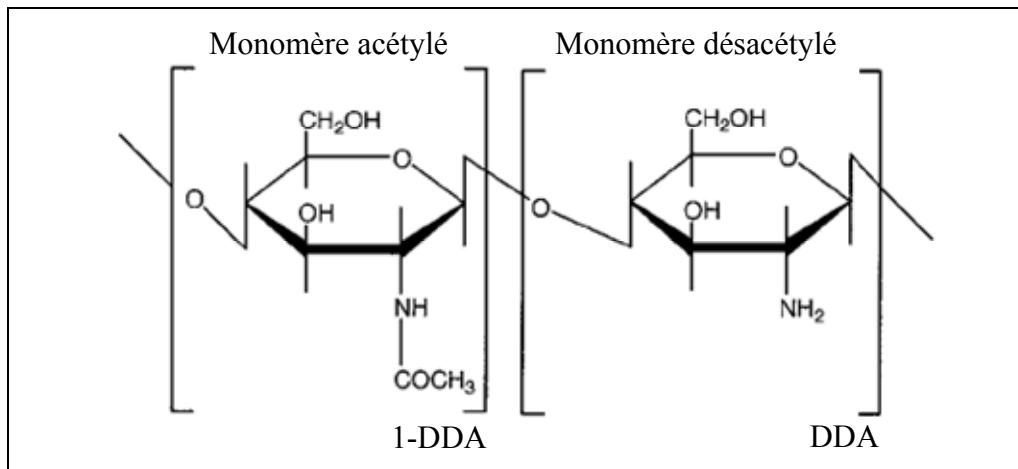


Figure 1.10 Les deux monomères composant le chitosane
Adaptée de Desbrieres (2002)

1.4.2 Le degré de désacétylation (DDA)

Le degré de désacétylation correspond au pourcentage de monomères désacétylés dans la chaîne polymérique. Pour parler de chitosane, il faut que la chitine soit désacétylée entre 50 % et 100 % (Cho *et al.*, 2006a; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007).

Le DDA a un impact majeur sur le comportement physicochimique de la molécule (Lavertu, 2007) qui pilote la solubilité (Rinaudo, 2008), le processus de gélification (Chenite *et al.*, 2001) et la cinétique de dégradation de la molécule (Chenite *et al.*, 2000; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007). Ce paramètre peut s'avérer très utile pour optimiser les comportements du chitosane pour une utilisation spécifique.

1.4.3 La masse moléculaire

Le chitosane étant un polymère, sa masse moléculaire moyenne (Mw) varie en fonction de la longueur moyenne des chaînes, c'est à dire le nombre moyen de motifs de base sur une chaîne de chitosane, et du DDA. Le DDA affecte un peu la Mw, car il y a une différence de 40 g/mol entre les monomères acétylé et désacétylé. Ces deux propriétés ont comme conséquence de faire varier la Mw du chitosane entre $5,0 \times 10^4$ et $2,0 \times 10^6$ g/mol (Chenite *et al.*, 2001).

Faire varier la Mw du chitosane a une répercussion sur les comportements de la solution et celles du gel (sera discuté ultérieurement) (Chenite *et al.*, 2000). La viscosité étant directement influencée par celle-ci, la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) est souvent employée pour déterminer la masse moléculaire de la molécule grâce à l'équation de Mark-Houwink (*voir* équation 1.1) (Desbrieres, 2002; Rinaudo, 2008).

$$[\eta] = (mL/g) = KM^a \quad (1.1)$$

où $[\eta]$ représente la viscosité intrinsèque, K et a sont des coefficients connus de l'équation de Mark-Houwink et M représente la masse moléculaire du chitosane

1.4.4 La solubilité

Le chitosane est une molécule qui ne peut pas être dissoute dans une solution neutre. Ce manque de solubilité par association physique (tendance des molécules à s'associer en solution) est attribuable en partie aux groupements méthine qui le compose, mais aussi aux groupements acétyle (-COCH₃) (Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Les groupements acétyle,

selon leur position et leur nombre, ont tendance à réduire la solubilité du chitosane (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). C'est cette diminution de l'accès de l'eau qui permet de produire des thermogels de chitosane, tel que décrit plus loin.

Pour dissoudre le chitosane, l'utilisation d'une solution aqueuse acide ($\text{pH} < 6$) est nécessaire à cause de sa constante de dissociation acide (pK_a) élevée ($\text{pK}_a \sim 6$) (Chenite *et al.*, 2001; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006c; Desbrieres, 2002; Rinaudo, 2008). Mis dans une solution acide, le chitosane吸orbe des ions hydrogènes sur ses groupements amines par protonation pour former des groupements $-\text{NH}_3^+$ (Chenite *et al.*, 2001; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Lorsque la molécule est suffisamment ionisée, la génération de forces électrostatiques répulsives entre les groupements $-\text{NH}_3^+$ permet de lutter contre le manque de solubilité et assure la solubilisation du chitosane (Chenite *et al.*, 2001; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Cette solubilité reste précaire, car une modification du pH ou de la force ionique du système peut induire une déionisation et sa précipitation.

Une fois en solution, le chitosane devient un polyélectrolyte (Lavertu, 2007; Rinaudo, 2008) et possède un coefficient de dissociation acide intrinsèque (pK_0) d'approximativement 6 (Chenite *et al.*, 2001; Desbrieres, 2002; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007; Rinaudo, Pavlov et Desbrières, 1999). Ainsi, lorsque le pH augmente au-dessus de 6, le degré d'ionisation (α) du chitosane diminue et les forces électrostatiques répulsives du même coup. Lorsque les forces répulsives deviennent insuffisantes pour assurer la solubilité, le chitosane précipite. L'état d'ionisation à la précipitation (α_p) correspond à l'ionisation minimale nécessaire pour garder le chitosane en solution et dépend du DDA et de la Mw du chitosane ainsi que de la force ionique de la solution (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008).

1.4.5 La biodégradabilité

Le chitosane est une matière intéressante dans le domaine médical, car c'est un matériau résorbable (Chenite *et al.*, 2000; Rinaudo, 2007). La dégradation du chitosane peut se faire de

façon chimique ou par voie enzymatique (Berger *et al.*, 2004a). La stérilisation par vapeur du chitosane en solution acide est un exemple de dégradation chimique qu'il est possible d'induire par une réaction d'hydrolyse acide. De manière enzymatique, il existe plusieurs enzymes qui attaquent de façon spécifique certaines parties de la chaîne polymérique. Par exemple, les lysozymes (enzyme sécrétée dans les fluides physiologiques) (Berger *et al.*, 2004a; Coma, 2009), la chitinase et les chitodextrins attaquent plus particulièrement la chitine alors que la chitosanase attaque le chitosane (Rinaudo, 2007). Une fois dégradé par les enzymes, il est éliminé dans les urines (Lavertu, 2007). La dégradation du chitosane est dépendante de la Mw, du DDA et de la concentration en chitosane, ce qui permet de faire une modulation du temps de résidence *in situ* (Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007). Diminuer la masse moléculaire, le DDA ou la concentration en chitosane écourt le temps de résidence (Coma, 2009; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Rinaudo, 2007). L'utilisation d'un matériau biodégradable pour l'embolisation des AAA est attrayante afin de promouvoir une guérison biologique par la formation d'un tissu fibreux intrasac plutôt qu'un agent permanent comme c'est présentement le cas avec les acrylates, le poly(éthylène et alcool vinylique) et les spirales métalliques.

1.4.6 Propriétés biologiques

Le chitosane est un biomatériau très prometteur en raison de ses propriétés biologiques. Il a été identifié comme étant un matériau biocompatible (Berger *et al.*, 2004b; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Coma, 2009; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007), non toxique (Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007) et biodégradable (Berger *et al.*, 2004b; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Coma, 2009; Jarry *et al.*, 2001; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Outre sa biocompatibilité, le chitosane possède des caractéristiques antifongiques (Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Jarry *et al.*, 2001; Rinaudo, 2008), antibactériennes (Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Jarry *et al.*, 2001; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007) et bactériostatiques (Berger *et al.*, 2004a) qui pourraient prévenir certaines complications. Le chitosane est bioadhésif (Berger *et al.*, 2004a;

Lavertu, 2007; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007), une caractéristique recherchée dans le domaine de l’embolisation afin de créer un lien fort entre l’embolie de chitosane et l’artère pour limiter l’apparition de fuite.

1.5 L’hydrogel de chitosane

Chenite *et al* (2001) ont été les premiers chercheurs à discuter de l’utilisation combinée du chitosane et du sel disodique de β -glycérophosphate (β GP) afin de produire un thermogel de chitosane gélifiant à la température du corps et possédant un pH physiologique (*voir* Figure 1.11) (Chenite *et al.*, 2001). Les avantages de ce type de produit dans le domaine médical (pH physiologique, injectabilité, gélification à température du corps, possibilité d’incorporer des cellules, etc) ont vite suscité de l’intérêt dans le monde de la recherche. Depuis, les connaissances au sujet du produit ont permis d’atteindre un niveau de compréhension où il est possible de moduler certains comportements de la solution et du gel en fonction de besoins bien précis. Des études ont été accomplies pour mieux comprendre le principe de formation du gel (Cho *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006b; 2006c; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008), l’influence des différentes caractéristiques du chitosane (Mw, DDA et polydispersité) sur les comportements physicochimiques, mécaniques et biologiques de la solution et du gel (Ahmadi et Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2001; Chenite *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2006a; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000), l’effet de la stérilisation et ses conséquences (Jarry *et al.*, 2001; Jarry *et al.*, 2002) ainsi que la possibilité d’utiliser d’autres éléments d’additions pour produire un thermogel de chitosane (Nair *et al.*, 2007).

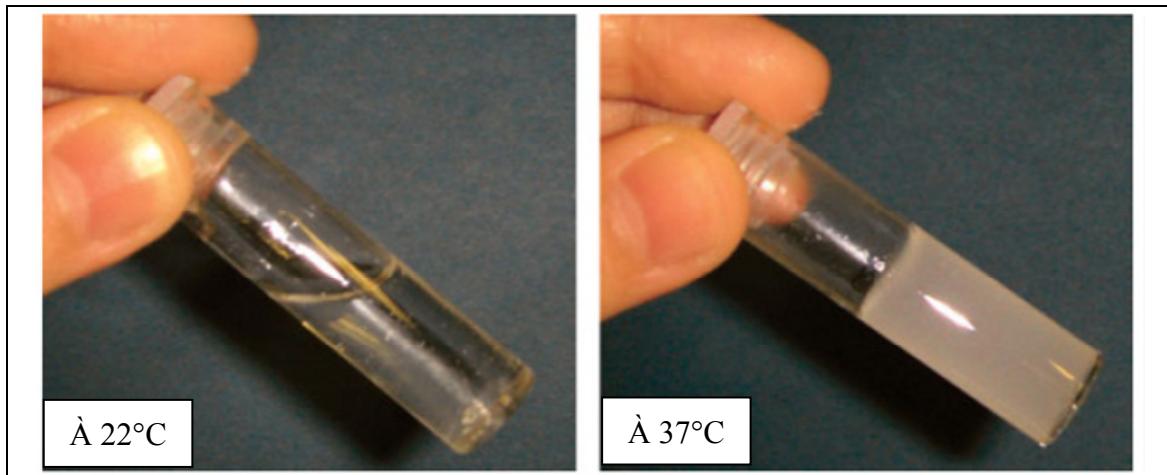


Figure 1.11 Solution de chitosane à 22°C qui se gélifie à 37°C
Adaptée d’Ahmadi et Bruijn (2008)

1.5.1 Principe de formation

Le processus de formation du thermogel de chitosane est assez particulier et il n'a été réellement compris que tout récemment avec l'étude de Lavertu *et al.* (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). C'est un processus hybride entre la modulation du pH et de la température. Le chitosane est tout d'abord mis en solution, il est ensuite stérilisé, mélangé avec une solution de β GP et finalement chauffé à 37 °C pour promouvoir sa gélification. De la mise en solution jusqu'à la gélification *in situ*, plusieurs éléments affectent les propriétés du gel résultant. Il est important de comprendre les différentes interactions qui se forment à chaque étape afin d'identifier les impacts que peuvent produire les AdC.

1.5.1.1 La mise en solution du chitosane

Le chitosane est un polymère insoluble à pH neutre et l'utilisation d'une solution acide est nécessaire pour le mettre en solution (Desbrieres, 2002). Dans la solution acide, des ions H^+ se greffent de façon ionique sur les groupements aminés ($-NH_2$) positionnés en C-2 (2^e carbone du cycle) du monomère D-glucosamine (Chenite *et al.*, 2001; Chenite *et al.*, 2000; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Jarry *et al.*, 2001; Rinaudo, 2008). Une fois cette

étape accomplie, les forces limitant la solubilité du chitosane (pont hydrogène, Van der Waals et interaction hydrophobe), sont compensées par les forces électrostatiques répulsives produites par les ions ammonium ($-\text{NH}_3^+$) (Chenite *et al.*, 2001). Le degré d'ionisation (α), qui représente le pourcentage de monomères glucosamine protonés, devient l'élément qui gouverne l'état du chitosane en solution. Lorsque le degré d'ionisation diminue sous l'état d'ionisation à la précipitation (α_p), les forces répulsives deviennent insuffisantes et le chitosane précipite (Chenite *et al.*, 2001). En solution, le chitosane se retrouve sous forme de polyélectrolyte et son degré d'ionisation varie en fonction de la température, du pH et de la force ionique (Lavertu, 2007; Rinaudo, Pavlov et Desbrières, 1999; Wang, 2000). Or, l'utilisation d'un AdC pour dissoudre le chitosane devrait avoir un impact sur le pH et sur la force ionique de la solution modifiant du même coup le degré d'ionisation du chitosane ainsi que les propriétés viscoélastiques de la solution. L'ajout d'un AdC risque fortement d'influencer le comportement du thermogel sous sa forme liquide.

1.5.1.2 Le mélange avec le β GP

L'ajout de β GP dans la solution de chitosane permet de former une solution relativement stable bien qu'à pH neutre. Le β GP, contenant des groupements fonctionnels hydroxyles ($-\text{OH}$), sous forme de polyol glycéro ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), et de phosphates de disodiques ($-\text{Na}_2\text{HPO}_4$), joue un rôle de tampon pour la solution et de stabilisateur pour le chitosane (Chenite *et al.*, 2001; Jarry *et al.*, 2002). Le β GP en solution, chargé négativement, est attiré par les $-\text{NH}_3^+$ du chitosane par des forces électrostatiques (Ahmadi et Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2005; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000). Les polyols du β GP auraient alors un effet hydratant sur le chitosane en contrôlant les liaisons hydrogènes chitosane-chitosane et permettraient de le garder en solution même à un pH entre 6,5 et 7,3 à 4 °C (Chenite *et al.*, 2001; Chenite *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2006a; Jarry *et al.*, 2001; Lavertu, 2007; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000). Une fois le β GP ajouté, l'ionisation du chitosane n'est plus seulement sensible à la variation du pH, mais aussi de la température, ce qui en fait une solution thermosensible (Ahmadi et Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2001; Chenite *et al.*, 2000; Cho et Heuzey, 2008; Jarry *et al.*, 2001; Ruel-Gariépy et Leroux, 2004).

1.5.1.3 Processus de gélification

La gélification du système CH/βGP avec une augmentation de la température se produit par une modification de certaines propriétés physicochimique du chitosane. Pour induire la gélification de ce système, le degré d'ionisation du chitosane (α) doit diminuer en dessous de l'état d'ionisation à la précipitation (α_p). Ce phénomène est possible grâce à la dépendance du pK_a du chitosane à la température.

Une étude sur la gélification du système CH/βGP a réussi à démontrer le principe fonctionnel de ce phénomène (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Pour réussir à y arriver, les auteurs ont fait appel à une technique de titration qui permet d'évaluer les pK_a sous différentes conditions (température, pH et force ionique de la solution, etc). Les résultats ont montré qu'une augmentation de la température produit un transfert de proton H^+ du chitosane vers le βGP produisant une neutralisation du chitosane. Une fois l'état d'ionisation à la précipitation (α_p) atteint, les forces électrostatiques répulsives deviennent insuffisantes pour lutter contre les forces attractives entre les chaînes ; il y a création d'un gel physique (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Durant la gélification, le βGP se diffuse et reste en suspension dans la phase liquide (Chenite *et al.*, 2001; Filion, 2006; Iliescu *et al.*, 2008).

D'autres additifs peuvent être utilisés pour produire un système thermosensible semblable à celui-ci. Pour ce faire, il est important d'utiliser un additif qui possède un pK_a près de celui du chitosane et qui ne varie pas en fonction de la température ; ça lui permet d'accepter les protons provenant du chitosane (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008).

1.5.2 Influence des différents paramètres

Les hydrogels de chitosane sont le résultat de multiples interactions. Ces interactions dépendent de plusieurs paramètres comme le DDA et la Mw du chitosane, la concentration en chitosane et en βGP dans la solution, le mode de stérilisation, la force ionique ainsi que le pH de cette solution. Tous ces paramètres rendent le système de CH/βGP complexe, mais lui

procure aussi un grand avantage, c'est-à-dire la possibilité de moduler certaines caractéristiques de l'hydrogel afin de répondre aux besoins précis d'une application.

1.5.2.1 Le degré de désacétylation (DDA)

Le DDA influence les comportements physicochimiques du chitosane, de la mise en solution jusqu'à la dégradation du gel. En solution, l'augmentation du DDA réduit la solubilité du chitosane (Filion, Lavertu et Buschmann, 2007). Dans le processus de transition sol/gel, l'augmentation du DDA permet de diminuer la température de précipitation (T_p) et le temps de gélification tout en accélérant la vitesse de gélification (Chenite *et al.*, 2000; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Jarry *et al.*, 2001; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000). La T_p , évaluée par transmittance laser ou en rhéométrie, est un élément important de la gélification, car elle représente la température minimale à laquelle la solution doit être chauffée pour produire une précipitation (gélification) **rapide** du chitosane (voir Figure 1.12A et B) (Chenite *et al.*, 2000; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Cet avantage devient cependant un inconvénient pour les dispositifs temporaires puisque la vitesse et le pourcentage de dégradation diminuent avec un accroissement du DDA (Chenite *et al.*, 2000; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Rinaudo, 2007; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

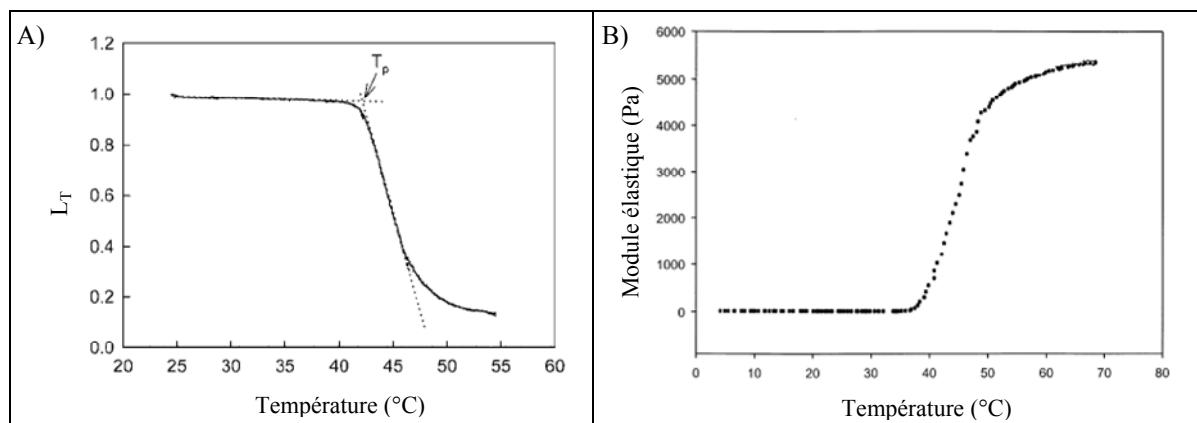


Figure 1.12 Évaluation de la température de précipitation (T_p) A) par transmittance laser et B) en rhéométrie

Adaptées de Lavertu, Filion et Buschmann (2008) et Chenite *et al.* (2000)

1.5.2.2 La masse moléculaire moyenne

La masse moléculaire moyenne du chitosane a plutôt un impact mécanique sur les propriétés de la solution et du gel de chitosane. Diminuer la Mw réduit la viscosité de la solution, la vitesse de gélification et la résistance du gel (Jarry *et al.*, 2001; Jarry *et al.*, 2002). L'effet sur la viscosité et la vitesse de gélification provient de la réduction de l'accrochage et de la friction entre les chaînes, tandis que la résistance mécanique répond à une diminution de la densité physique des zones de jonctions (Jarry *et al.*, 2001; Kuo et Ma, 2001). Cette diminution de densité a aussi un impact sur la vitesse de relargage des médicaments ou des molécules libres de la phase liquide du gel (Jarry *et al.*, 2001; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

1.5.2.3 Les concentrations

La concentration en chitosane dans le système CH/βGP peut aussi être utilisée pour moduler les caractéristiques et comportements de la solution et du gel. La concentration en chitosane influence aussi bien de façon mécanique que physicochimiques. Avec des concentrations plus élevées en chitosane, les propriétés viscoélastiques sont augmentées (η^* , modules G' et G'') (Cho *et al.*, 2006a; Desbrieres, 2002; Kuo et Ma, 2001). Dans le processus de gélification, une augmentation de la concentration diminue la T_p , le temps de gélification ainsi que la vitesse de gélification (Ahmadi et Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2001; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007). L'amélioration des propriétés mécaniques et de la vitesse de dégradation du gel obtenu peut se faire par une augmentation de la concentration de chitosane incorporée dans la solution (Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Kuo et Ma, 2001). Finalement, une forte concentration en chitosane diminue la toxicité du gel et aiderait la prolifération des cellules souches mésenchymateuse (gMSC) (Ahmadi et Bruijn, 2008).

L'influence de la concentration en βGP dans la solution de chitosane est un peu différente. Le fait d'ajouter une plus grande quantité de ce sel change les comportements physicochimiques de l'hydrogel. L'ajout de βGP a comme premier effet d'augmenter le pH, la force ionique et

les propriétés viscoélastiques (η^* , modules G' et G'') de la solution (Chenite *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2006a). Ceci produit une diminution de la T_p et du temps de gel (t_{gel}) (Ahmadi et Bruijn, 2008; Chenite *et al.*, 2001; Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006a; Filion, Lavertu et Buschmann, 2007; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007), mais n'affecte pas la cinétique de gélification lorsque la solution est chauffée à sa T_p (Cho *et al.*, 2006a). L'utilisation d'une forte concentration en β GP mène à une augmentation de l'osmolalité des produits de relargage, un paramètre pouvant jouer dans la mort cellulaire (Ahmadi et Bruijn, 2008).

1.5.2.4 La force ionique

La force ionique de la solution dans laquelle le chitosane est dissout influence les comportements physicochimiques du chitosane. L'écrantage (blindage) par des ions ou molécules ioniques produit une modification de la conformation et du potentiel de surface du chitosane, ce qui a un effet sur la viscosité de la solution, la T_p , la morphologie du réseau polymérique et la vitesse de relargage de certains constituants (gradient de diffusion). Entre autres, l'augmentation de la concentration en sel augmente l' α_p , le pK_a du chitosane, ce qui facilite la protonation, et la T_p des solutions CH/ β GP dues à l'augmentation de α du chitosane qu'il produit (Filion, Lavertu et Buschmann, 2007; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008).

1.5.2.5 La stérilisation

La solution de chitosane doit être stérilisée avant d'être injectée dans le corps humain. L'impact et la faisabilité de la stérilisation, que ce soit de façon thermique, par irradiation ou par filtration, est difficile ou encore très dommageable pour les chaînes moléculaires de chitosane (Rinaudo, 2007). La stérilisation à l'autoclave produirait moins de dommage que les autres techniques (irradiation γ , oxyde d'éthylène et glutaraldéhyde) (Jarry *et al.*, 2001). Elle engendrerait tout de même une diminution de 30 % de la M_w après 10 minutes à 121 °C, mais resterait relativement stable après 15 minutes (Jarry *et al.*, 2001). La stérilisation n'affecte pas le DDA, la possibilité de former un gel, le temps de gélification ni la

polydispersité (Jarry *et al.*, 2001; Jarry, Shive et Chenite, 2007). La perte de masse se traduirait par une diminution de la viscosité, de la vitesse de gélification et des propriétés mécaniques du gel obtenu (Jarry *et al.*, 2001; Ruel-Gariépy et Leroux, 2004). Comme agent embolisant, le chitosane possédant une Mw élevée devrait être favorisé pour contre balancer cette perte de masse afin d'obtenir des propriétés mécaniques accrues.

1.6 Les agents de contraste (AdC)

Le chitosane n'étant pas radio-opaque, l'incorporation d'un AdC devient nécessaire afin de faire un suivi lors de l'injection pour s'assurer de l'occlusion complète du sac anévrismal sans migration du produit dans le système cardiovasculaire. Des AdC liquides, qui ont été développés pour être injectés dans les vaisseaux sanguin et suivre les arborescences vasculaires par rayons X, peuvent être utilisés à cette fin. Les AdC ont évolué depuis le début de leur utilisation afin de réduire les interactions avec l'organisme et les effets secondaires qu'ils produisent (Krause et Niehues, 1996). Il existe à ce jour plusieurs agents de contraste liquide qui se regroupent sous 3 générations. L'utilisation de poudre métallique pourrait aussi être envisagée, mais leur trop forte radio-opacité et les risques de relargage dans l'organisme diminuent l'intérêt de cette approche.

1.6.1 1^{re} génération

La première génération d'AdC regroupe les produits ioniques hypertoniques, où l'iode se trouve sous forme ionique (voir au chapitre 2) (Krause et Niehues, 1996). Ces produits hypertoniques provoqueraient le relargage de fortes doses d'histamine dans l'organisme, ce qui produirait des sensations de chaleur et de douleur semblable à une réaction pseudoallergique (Caron, 2002; Krause et Niehues, 1996). De plus, les molécules ioniques de la solution sont plus à risques de produire des réactions avec l'organisme (Krause et Niehues, 1996). Cependant, ces AdC pourraient être intéressants avec le chitosane étant donné que le caractère ionique pourrait permettre la création de liaisons ioniques avec le chitosane et améliorer certaines propriétés.

1.6.2 2^e génération

La 2^e génération est composée des agents non ioniques hypertoniques, c'est-à-dire où l'iode est présente sous forme non ionique, mais où l'osmolalité est supérieure à celle des tissus biologiques (Krause et Niehues, 1996). Cette génération est une amélioration face à la première, car elle réduit les risques d'interactions avec l'organisme par leur côté non ionique (Krause et Niehues, 1996). Toutefois, puisqu'ils sont toujours hypertoniques, ils peuvent produire une libération d'histamine et créer un sentiment d'inconfort.

1.6.3 3^e génération

La 3^e génération d'AdC, plus récente, est constituée des agents non ioniques isotoniques (Krause et Niehues, 1996). En réglant les questions de charge ionique et de tonicité, ces produits possèdent une meilleure biocompatibilité (Krause et Niehues, 1996). Cette biocompatibilité améliorée découle de la forte hydrophilicité et du faible effet chimiotoxique de ces agents (Krause et Niehues, 1996).

1.7 Objectifs

La réparation endovasculaire (EVAR) est une approche prometteuse pour traiter les anévrismes de l'aorte abdominale. Malgré des avancées dans le domaine, la perfusion persistante du sac anévrismal par le sang diminue le succès de l'intervention. Pour contrer cette problématique, nous proposons ici de créer un nouvel agent embolisant à partir d'un thermogel de chitosane. Le chitosane n'étant pas un produit radio-opaque en radiologie, l'addition d'un produit de contraste est nécessaire pour que le thermogel puisse être injecté de façon sécuritaire dans le sac anévrismal.

L'incorporation d'un AdC dans la solution de chitosane risque de changer les comportements physicochimiques et ainsi modifier plusieurs caractéristiques importantes à l'élaboration d'un produit efficace et sécuritaire pour emboliser. Nous avons vu qu'il existe plusieurs types

d'AdC ayant des caractéristiques différentes (tonicité, ionicité, etc). Il est important de déterminer laquelle s'apprêterait le mieux pour développer le thermogel embolisant. Pour atteindre cet objectif, il est essentiel de comprendre de quelle façon chacune de ces générations affecte le comportement de la solution de chitosane.

Le but de ce projet de maîtrise consiste donc à étudier l'influence de l'incorporation d'AdC dans une solution thermogélifiante de chitosane. Les différentes caractéristiques correspondant à un bon agent embolisant injectable pour l'anévrisme de l'aorte abdominale étant la viscosité de la solution, la cinétique de gélification, la résistance mécanique, le relargage de l'agent radio-opaque et le potentiel cytotoxique des produits de relargage, ces derniers serviront d'élément comparatif. Cette étude évaluera d'une part l'impact d'un produit de 2^e génération d'AdC (Isovue[®] -370) sur les différentes propriétés en fonction de la concentration utilisée. En parallèle, 3 générations d'AdC (Conray[®] 60, Isovue[®] -370 et Visipaque[®] -320) seront testées pour déterminer lequel d'entre eux permet d'optimiser les comportements du thermogel de chitosane pour l'embolisation des AAA.

À la fin de la recherche, il sera possible de déterminer la faisabilité de développer un agent embolisant à base de chitosane ainsi que le type d'AdC et la concentration à utiliser pour obtenir les meilleures propriétés désirées. L'étude permettra du même coup de faire la lumière sur la nécessité d'apporter des modifications à la formulation pour obtenir un produit sécuritaire et efficace et de proposer quelques pistes de solutions.

CHAPITRE 2

EXPÉRIMENTATION

2.1 **Synthèse du thermogel de chitosane**

2.1.1 **Matériel**

Dans le cadre de ce projet, deux types de chitosane ont été employés :

1. Chitosane de grade ultra pur provenant de Biosyntech inc. (Laval, QC, Canada) avec un degré de désacétylation de 82,8 % et une masse moléculaire moyenne de $4,18 \times 10^5$ g/mol.
2. Chitosane de grade pur provenant de Mainard Biotech (Rivière-au-Renard, QC, Canada) avec un degré de désacétylation de 94,4 % et une masse moléculaire moyenne de $2,99 \times 10^5$ g/mol (masse moléculaire approximative calculée).

Le premier, de grade ultra pur, est utilisé pour les essais biologiques *in vitro* et constitue la matière de base pour de futurs essais *in vivo*. La composition de ce chitosane a été choisie de façon à obtenir de bonnes propriétés mécaniques, une gélification rapide, un faible potentiel cytotoxique et une dégradation *in vivo*. Puisque ce dernier a été fourni en quantité limitée et n'était ensuite plus disponible, un second chitosane a été utilisé, de façon plus restreinte, pour confirmer les tendances observées avec le chitosane de grade ultra pur et pour étudier l'effet du DDA sur les propriétés des gels.

Les autres produits utilisés pour produire les thermogels de chitosane sont le sel disodique hydrate de β -glycérophosphate (β GP) et l'acide chlorhydrique (HCl).

1. Sel disodique hydrate de β -glycérophosphate provenant de Sigma-Aldrich ltd. (Oakville, ON, Canada) possédant une masse moléculaire de 216,04 g/mol. Numéro CAS : G9891.
2. Acide chlorhydrique concentré à 36,5-38,0 % provenant de Fisher Scientifique (Ottawa, ON, Canada) possédant une masse moléculaire de 36,46 g/mol. Numéro CAS : 7647-01-0.

Pour étudier l'effet de l'ajout d'un AdC à la solution de chitosane, 3 AdC représentant les 3 générations de produits iodés ont été utilisées (*voir* Tableau 2.1). Ces 3 AdC se différencient par leur ionicité (ionique ou non-ionique), leur tonicité (isotonique ou hypertonique) et la structure de la molécule active contenant l'iode.

1. La première génération d'AdC est représentée par le Conray[®] 60¹, une solution ionique et hypertonique, produite par Mallinckrodt Inc. (Hazelwood, MO, USA). La molécule active dimérique de ce produit est le sel de méglumine iothalamate (*voir* Figure 2.1A), qui possède une masse moléculaire de 809,12 g/mol, à une concentration de 60 % m/v (600 mg/ml). En solution, étant un sel, le Conray[®] se divise en deux molécules ioniques, soit un anion iothalamate contenant l'iode et un cation méglumine. La tonicité du Conray[®] 60 est de 1400 mOsm/kg, la viscosité de 4,0 cP (4,0 mPa.s) à 37 °C et il fournit une concentration de 282 mg/ml d'iode lié organiquement. Un tampon monobasique de phosphate de sodium (H₂NaPO₄) est incorporé pour ajuster le pH entre 6,5 et 7,7. Numéro CAS : 13087-53-1 ;
2. l'Isovue[®] -370², agent de 2^e génération, est une solution non ionique et hypertonique produite par Bracco Diagnostic inc. (Mississauga, ON, Canada). L'ingrédient actif de

¹ Information de la FDA recueillie sur le site de DailyMed à l'adresse internet : <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=31215>>, consulté le 27 juin 2011.

² Information de la FDA recueillie sur le site de DailyMed à l'adresse internet : <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=3359>>, le 1er mars 2010.

cette solution est l'iopamidol (*voir* Figure 2.1B), une molécule monomérique possédant une masse moléculaire de 777,08 g/mol, concentrée à 76 % m/v (755 mg/ml). L'iode se retrouve sous forme de molécules neutres, mais elle demeure tout de même hypertonique. La tonicité de ce produit est de 796 mOsm/kg, la viscosité de 9,4 cP (9,4 mPa.s) à 37 °C et il fournit l'équivalent de 370 mg/ml d'iode lié organiquement. Le pH est ajusté entre 6,5 et 7,5 grâce à du HCl et de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Numéro CAS : 60166-93-0 ;

3. l'agent de 3^e génération, le Visipaque[®] -320³, est un agent non ionique isotonique produit par GE Healthcare inc. (Rahway, NJ, USA). Le Visipaque[®] est composé de molécules actives monomériques, l'iodixanol (*voir* Figure 2.1C), possédant une masse moléculaire de 1550,2 g/mol à une concentration de 65 % m/v (652 mg/ml). La tonicité de la solution est de 290 mOsm/kg avec une viscosité de 11,8 cP (11,8 mPa.s) à 37 °C et procure 320 mg/ml d'iode liée organiquement. Le pH est ajusté entre 6,8 et 7,7 grâce à du HCl et du NaOH. Numéro CAS : 92339-11-2.

Tableau 2.1 Caractéristique des agents de contraste étudiés

Produit (Numéro CAS)	Génération de produit	Élément actif (masse moléculaire)	Ionicité	Tonicité à 37 °C (osmolalité)	Viscosité à 37 °C
Conray[®] 60 (13087-53-1)	1 ^{re} génération	Sel de méglumine iothalamate (809,17 g/mol)	Ionique	Hypertonique (1400 mOsm/kg)	4,0 cP
Isovue[®] -370 (60166-93-0)	2 ^e génération	Iopamidol (777,09 g/mol)	Non- ionique	Hypertonique (796 mOsm/kg)	9,4 cP
Visipaque[®] -320 (92339-11-2)	3 ^e génération	Iodixanol (1550,20 g/mol)	Non- ionique	Isotonique (290 mOsm/kg)	11,8 cP

³ Information de la FDA recueillie sur le site de DailyMed à l'adresse internet : <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=9704>>, le 1er mars 2010.

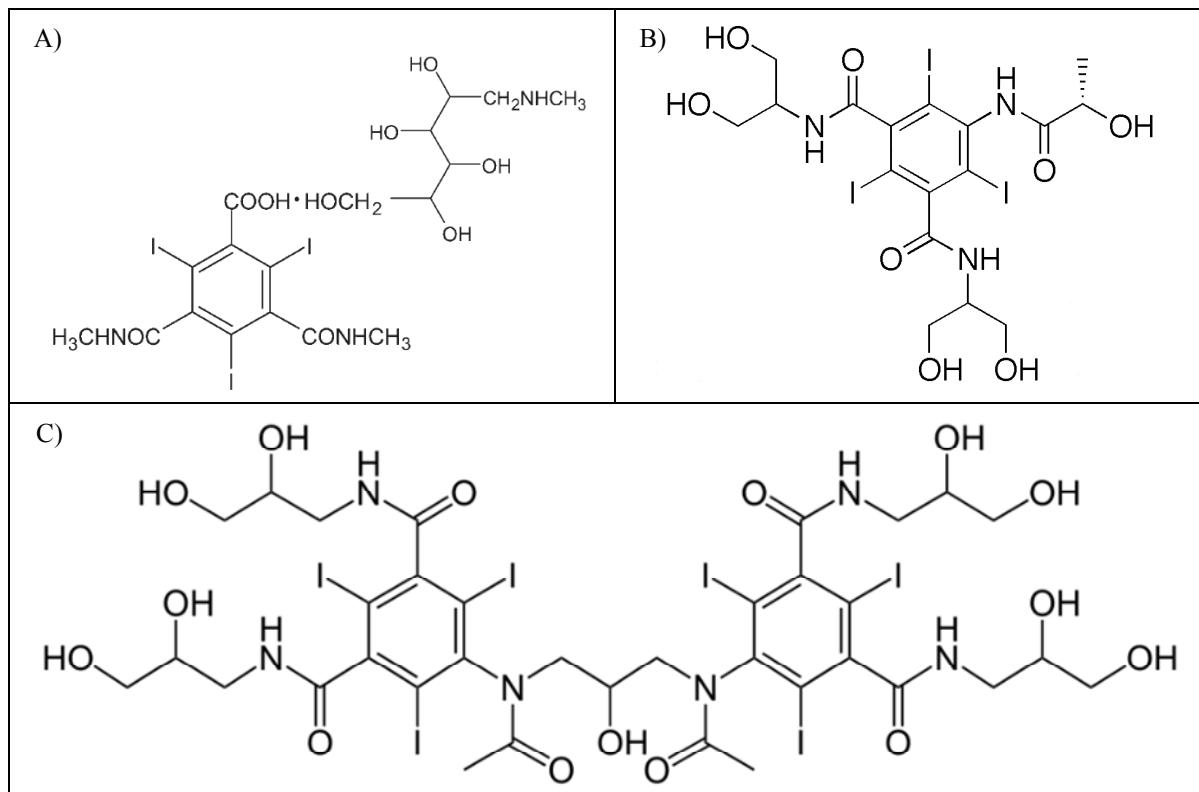


Figure 2.1 Structure moléculaire des molécules actives des agents de contraste A) sel de méglumine iothalamate (Conray®), B) iopamidol (Isovue®) et C) iodixanol (Visipaque®)

2.1.2 Préparation de la solution

Dans le cadre de cette étude, une composition finale de 2% m/v de chitosane et de 12% m/v de β GP a été choisie pour le thermogel, basée sur la littérature (Chenite *et al.*, 2000). La concentration en AdC a été variée entre 0 et 30% v/v pour l’Isovue®, alors que seule la concentration de 20% v/v a été étudiée pour le Visipaque® et le Conray® (*voir* Tableau 2.2). Le choix des concentrations en AdC a été fait en fonction d’essais préliminaires, de discussions avec le radiologue Dr Soulez du Centre hospitalier de l’université de Montréal (CHUM Notre-Dame) et de la consultation de la littérature.

Pour ce faire, des solutions aqueuses d’HCl 0,1M avec une concentration de 0 ; 15,8 ; 31,5 ou 47,3 % v/v d’Isovue® ou de 31,5 % v/v de Visipaque® ou de Conray® ont été produites pour

dissoudre le chitosane. À l'aide d'un agitateur, le chitosane a été incorporé dans chacune de ces solutions pour obtenir une concentration finale en chitosane de 3,13 % m/v. Les solutions ont été ensuite stérilisées à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes et entreposées à 4 °C au réfrigérateur.

En parallèle, du sel disodique de β GP était dissout dans de l'eau déionisée à une concentration de 33,3 % m/v en quantité suffisante pour compléter les solutions de chitosane. La solution aqueuse était par la suite filtrée à l'aide d'un filtre de 0,20 μ m et entreposée à 4 °C jusqu'au moment de son utilisation.

Tableau 2.2 Formulations de chitosane avec β GP et AdC étudiées

	[Chitosane] (% m/v)	[β GP] (% m/v)	[Isovue [®] -370] (% v/v)	[Visipaque [®] -320] (% v/v)	[Conray [®] 60] (% v/v)
CH	2	12	0	-	-
CH ISO 10	2	12	10	-	-
CH ISO 20	2	12	20	-	-
CH ISO 30	2	12	30	-	-
CH VIS 20	2	12	-	20	-
CH CNR 20	2	12	-	-	20

2.2 Essais rhéométriques

Pour évaluer les caractéristiques viscoélastiques des solutions de chitosane, un rhéomètre MCR 301 de Anton Paar (Saint-Laurent, QC, Canada) à cisaillement dynamique a été employé (*voir* Figure 2.2). À l'aide d'une géométrie cylindres concentriques (CC10) de 1 ml, il a été possible de faire un suivi de la viscosité complexe (η^*) (*voir* équation 2.1 plus loin), du module de conservation (G') et du module de perte (G'') des solutions au cours du temps à température contrôlée. Pour déterminer les propriétés mécaniques en cisaillement des gels obtenus, l'utilisation d'une géométrie plan-plan (PP25/TG) de 25 mm de diamètre a été nécessaire. Tous les tests ont été accomplis de façon à rester dans le domaine linéaire de déformation du réseau de chitosane, soit une déformation inférieure à 0,01 (Cho et Heuzey, 2008; Cho *et al.*, 2006c). Au-delà de cette déformation, le réseau polymérique aurait pu être endommagé et la formation du gel ralentie. Les essais ont été répétés en triplicata.



Figure 2.2 Rhéomètre MCR 301 avec géométrie cylindres coaxiaux

2.2.1 Géométrie cylindres concentriques

La géométrie concentrique a permis de faire un suivi de l'évolution des caractéristiques viscoélastiques des solutions de chitosane incorporant les différents AdC. La température de l'échantillon a été établie à 37 °C pour simuler la température physiologique, la fréquence de test à 1 Hz, la contrainte de cisaillement à 1 Pa et le volume d'échantillon à 1 ml. L'interprétation des données a permis de déterminer la viscosité initiale (η) des solutions, le t_{gel} ainsi que la vitesse de gélification.

2.2.1.1 La viscosité initiale

La viscosité initiale (η) des échantillons a été estimée grâce à la relation de Cox-Merz (voir équation 2.1) qui établit le lien entre la viscosité complexe (η^*), obtenue en rhéométrie, et la viscosité permanente (η), plus représentative de la viscosité d'une solution (Cho *et al.*,

2006c; Cox et Merz, 1958). Cette relation est valide pour les polymères flexibles non associatifs (Cho *et al.*, 2006c).

$$|\eta^*(\omega)| = \eta(\dot{\gamma})|_{\dot{\gamma}=\omega} \quad (2.1)$$

où ω représente la fréquence d'essai et $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement

2.2.1.2 Le temps de gélification

Le temps de gélification correspond au temps écoulé entre le moment où la solution est chauffée et le début de la gélification. Cette propriété a été déterminée pour les diverses solutions de chitosane grâce à l'approche de Winter et Chambon (Winter, 1987; Winter et Chambon, 1986). Le début de la gélification correspond au moment où les modules de conservation et de perte respectent l'équation 2.2, c'est-à-dire à l'intersection des courbes G' et G'' (voir Figure 2.3).

$$G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n \quad (2.2)$$

Cette loi de puissance est très utile pour déterminer facilement le temps de gélification. Toutefois, elle implique qu'un temps de gélification peut être différent selon la fréquence de test (Winter, 1987; Winter et Chambon, 1986). Restant conscient de cet aspect, le choix d'utiliser une seule fréquence répond au besoin de simplicité et de faisabilité en ce qui concerne la quantité de chitosane disponible, tout en permettant de faire une comparaison entre les formulations. De plus, cette technique est acceptée et utilisée fréquemment dans la littérature (Chenite *et al.*, 2001; Hamdine et Heuzey, 2009; Song *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011).

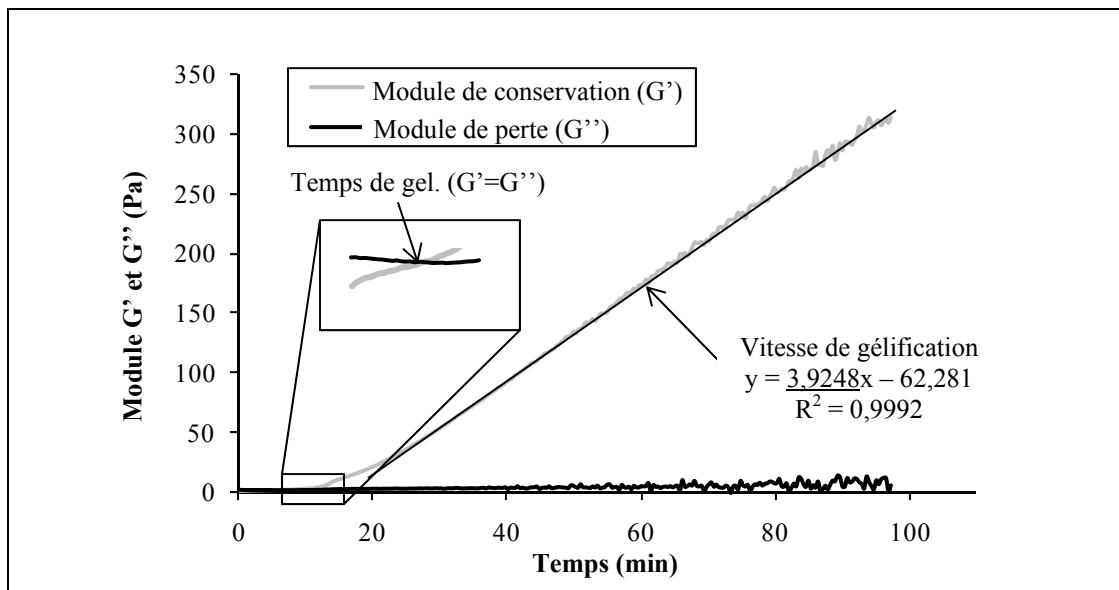


Figure 2.3 Courbe standard d'un essai rhéométrique avec une géométrie cylindres coaxiaux et détermination du t_{gel} et de la pente de gélification

2.2.1.3 La vitesse de gélification

Dans la littérature, il n'y a pas beaucoup de travaux qui s'attardent à la vitesse de gélification des agents embolisant liquides. Pourtant, la vitesse de gélification fait référence à la vitesse à laquelle le réseau polymérique se forme et gagne en rigidité après le début de la gélification. Il s'agit d'un élément important pour cette application. Une gélification trop rapide réduit les chances d'oblitérer l'anévrisme de façon distale et augmente les possibilités de récurrences tandis qu'une gélification trop lente peut mener à la migration et l'embolisation non ciblée. Afin d'évaluer l'impact des agents de contraste sur cet aspect, une technique simple a été utilisée. Le suivi rhéométrique des propriétés viscoélastiques a démontré que l'évolution du module G' augmente de façon linéaire après le début de la gélification. En utilisant une droite de régression, il a été possible de quantifier la vitesse d'évolution du module G' et ainsi comparer les vitesses de gélifications (*voir* Figure 2.3). Le coefficient de corrélation (R^2) de cette technique a été supérieur à 98 % dans tous les cas.

2.2.2 Géométrie plan-plan

L'utilisation d'une géométrie plan-plan en rhéométrie avait deux objectifs, soit déterminer si les échantillons avaient formé des gels respectant la définition formulée précédemment et vérifier leur résistance mécanique en cisaillement. Pour affirmer que les produits testés étaient bel et bien des gels, le module G' devait démontrer un plateau sur une gamme de fréquences et être nettement supérieur au module G'' sur cette même gamme de fréquences. La résistance en cisaillement a quant à elle été déterminée par le module de conservation (G'). Les échantillons ont été produits en incorporant 1,5 ml des solutions finales dans une plaque de culture 12 puits (plaque P12) qui était par la suite mise dans un incubateur à 37 °C pendant 7 jours. Lors du test de rhéométrie, un balayage de fréquence logarithmique entre 0,1 et 100 Hertz sous une contrainte de 1 Pa permettaient d'évaluer le module de conservation (G') du réseau tridimensionnel de chitosane tout en confirmant la stabilité du gel. L'entrefer lors du test était de 2000 μm , alors que la hauteur de l'échantillon était de 3000 μm .

2.3 Essais en compression

Tel que souligné précédemment, la caractérisation mécanique des hydrogels est un élément assez complexe à cause de leur nature. À la suite de la revue de la littérature, il a été constaté qu'il n'existe pas de normes établies pour faire la caractérisation de ce type de matériau. Généralement, les paramètres de tests sont déterminés de façon arbitraire et sont choisis en fonction des références bibliographiques consultées. La vitesse de chargement, la déformation appliquée, la dimension des échantillons et le type de test sont tous des facteurs qui modifient les résultats.

Dans l'étude actuelle, le choix d'un essai non confiné a été préféré aux autres pour sa simplicité, mais aussi parce qu'il est majoritairement utilisé pour les gels dans la littérature (Armstrong, Lai et Mow, 1984; Chung *et al.*, 2009; Coviello *et al.*, 2005; Hamdine et Heuzey, 2009; Ho, Lowman et Marcolongo, 2006; Joshi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009b; Stammen *et al.*, 2001; Wang et Stegemann, 2010a; 2010b). L'essai non confiné consiste à

faire un test de compression alors que l'échantillon n'est pas contraint latéralement ; il peut donc se déformer dans cette direction. Ce type de test permet d'obtenir des caractéristiques subjectives intéressantes au projet, comme la dureté, la cohésion et les modules sécants en compression (Coviello *et al.*, 2005; Friedman, Whitney et Szczesniak, 1963; Jones, Woolfson et Djokic, 1996; Jones *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1997).

Comme pour les essais de rhéométrie plan-plan, après avoir mélangé les solutions de chitosane et de β GP, 1,5 ml de chacune des formulations a été incorporé dans des trous d'une plaque P12 et laissé gélifié pendant 7 jours. La production d'échantillons cylindriques de 6 mm de diamètre par 3 mm de hauteur a été accomplie grâce à un poinçon à biopsie, à raison de 3 échantillons par trou. Le test de compression non confiné a été réalisé sur une machine de compression Mach-1TM (Biomomentum, Laval, QC, CA) gracieusement mise à notre disposition par la compagnie Biomomentum selon le montage à la Figure 2.4. Une fois immergé dans la solution saline (0,9 % w/v en NaCl, 300 mOsm/L), simulant le contexte physiologique, l'échantillon a été laissé au repos pendant 5 minutes afin d'atteindre l'équilibre de gonflement du gel. Une pré-charge de 0,3 g a été appliquée sur les échantillons pour s'assurer du bon positionnement du palpeur. Puis deux compressions successives entrecoupées par une période de relaxation de 30 s (*voir* Figure 2.5) ont été effectuées ce qui permet d'évaluer plusieurs caractéristiques tel que détaillé plus loin, ainsi que leur évolution entre 2 cycles de compression.

Cette méthode fait appel à la théorie énoncée par Friedman *et al.* (1963) pour la caractérisation de produits alimentaires (Friedman, Whitney et Szczesniak, 1963). L'alginate de calcium représentant probablement le meilleur produit en cours de développement pour l'embolisation des AAA, la déformation des échantillons a été établie à 40 % de la hauteur initiale à la suite de la lecture d'article de caractérisation en compression de l'alginate (Becker, Kipke et Brandon, 2001; Kuo et Ma, 2001; Lee *et al.*, 2009a). Sachant que les gels sont viscoélastiques, la vitesse de sollicitation a un impact direct sur les résultats en compression. Il aurait été préférable de faire une étude établissant la vitesse idéale de sollicitation, mais les conditions ne le permettaient pas (temps, matériel, disponibilité

machine, etc). Le choix de la vitesse de compression s'est fait avec ce qui était présent dans la littérature et elle a été établie à 100 %/min (Ho, Lowman et Marcolongo, 2006; Joshi *et al.*, 2006; Stammen *et al.*, 2001). Un fichier texte contenant les résultats (temps, position et charge) était enregistré à fin d'analyse. Les essais ont été faits en triplicata.

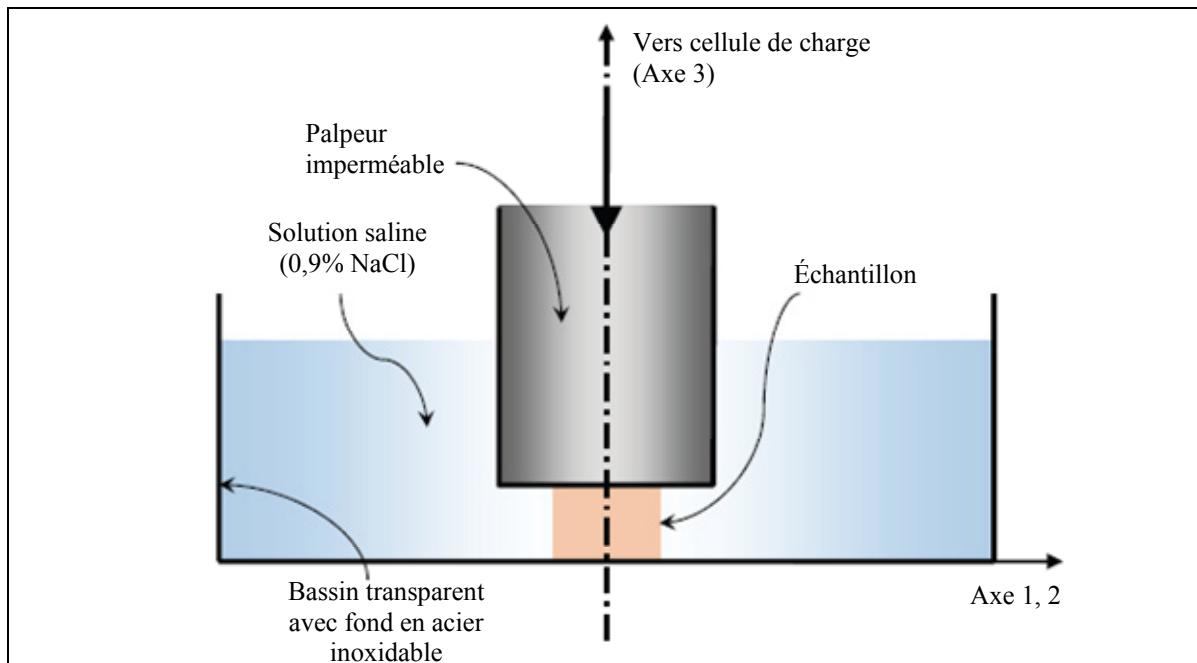


Figure 2.4 Schéma représentant le montage pour les essais de compression non confinée
Adaptée de Sergerie *et al.* (2009)

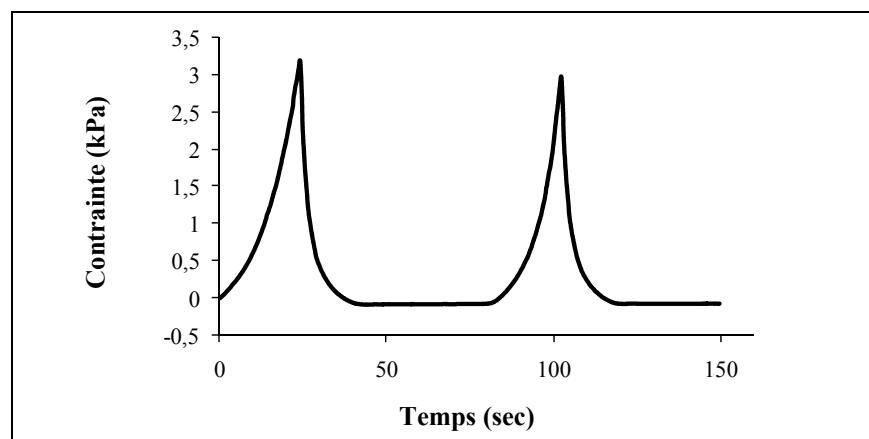


Figure 2.5 Exemple d'un résultat suite à l'essai de compression

L'analyse des résultats a été effectuée grâce au programme « Mach-1™ Analysis » (Biomomentum, Laval, QC, CA). Cette analyse a permis de déterminer des caractéristiques intéressantes comme la « cohésion », la « dureté » et le module sécant en compression des gels. Cette méthode d'analyse a été employée dans quelques études de caractérisation des gels avec cependant quelques variantes (Andrews, Gorman et Jones, 2005; Coviello *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009). Voici comment les résultats ont été interprétés dans le cadre de cette recherche :

- la dureté correspond à la force maximale transformée en contrainte d'ingénierie à 40 % de déformation observée durant la première compression (la contrainte d'ingénierie, quoique moins précise pour les matériaux très élastiques, a été choisie pour faciliter l'interprétation des résultats) (*voir Figure 2.6A*) ;
- le pourcentage de perte en dureté correspond à la force maximale lors de la 2^e compression divisée par celle de la 1^{re}. Cela permet de quantifier principalement les dommages produits sur le réseau tridimensionnel de chitosane ;
- la cohésion fait appel à l'énergie nécessaire pour déformer le gel lors de la première compression et correspond à l'aire sous la courbe déterminé grâce au programme d'analyse (*voir Figure 2.6A*) ;
- le pourcentage de perte en cohésion correspond à l'énergie nécessaire pour déformer le gel lors de la 2^e compression divisée par celle de la 1^{re}. Ce critère permet de quantifier les dommages produits sur le réseau tridimensionnel et la diminution de l'occlusion stérique entre les phases liquide et solide ;
- les modules sécants correspondent à la pente de la droite contrainte-déformation à une déformation donnée (*voir Figure 2.6B*).

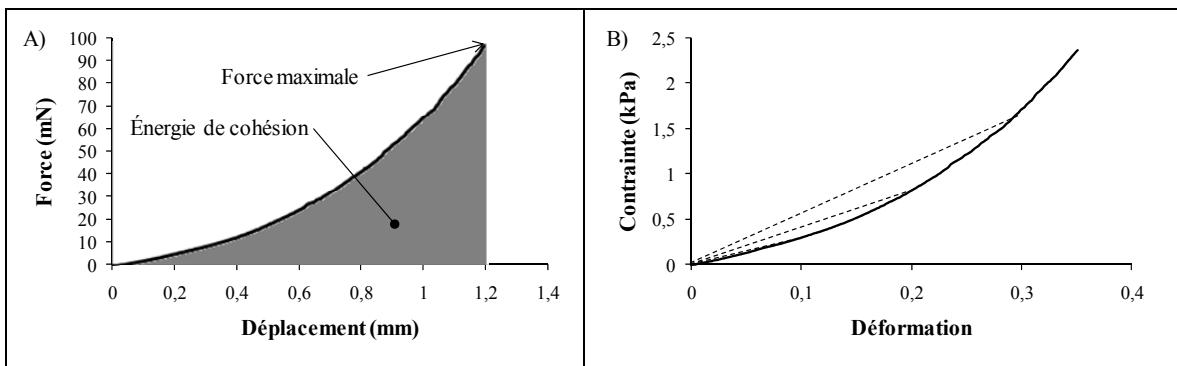


Figure 2.6 A) Exemple de l'évaluation de la dureté et de l'énergie de cohésion et B) des modules sécants en compression à 20 et 30 % de déformation

2.4 Essais tomodensitométriques

Pour comparer la radio-opacité des différentes formulations ainsi que le relargage de l'AdC en fonction du temps lorsque le gel est immergé, l'emploi d'un tomodensitomètre Somatom Sensation 64 (Siemens, Deerfield, IL, USA) a été nécessaire. Cet appareil permet de produire une image radiologique où il est possible de déterminer, grâce à un programme informatique d'analyse, le nombre d'unités Hounsfield d'une région spécifique de l'image. L'unité Hounsfield, qui fait référence à l'atténuation des rayons X qu'un corps quelconque produit, permet de quantifier l'intensité de contraste de la zone ciblée (Sahani *et al.*, 2007). Les paramètres du tomodensitomètre lors des essais sont compilés dans le Tableau 2.3 et ont été établis selon les recommandations du Dr Soulez, radiologue au CHUM Notre-Dame (Montréal, QC, CA).

Une fois les images numériques récupérées, la densité d'unités Hounsfield de chacun des gels a été obtenue grâce au programme d'analyse d'imagerie radiographique « efilm workstation 1.5.3 software » (Merge Healthcare, ON, CA).

Tableau 2.3 Valeur des paramètres lors de la radiographie CT scan

Paramètre	Valeur
Épaisseur de reconstruction	2 mm
Pas	0,7
Voltage	120 kV
Intensité	58 mA
Rotation	0,37 s
Collimation	64,06

2.4.1 Radio-opacité des gels

Pour comparer l'intensité de contraste des gels, des aliquotes de 0,5 ml des formulations composées sans ou avec 20 % v/v des divers agents de contraste ont été gélifiées dans des seringues tronquées à une température de 37 °C. Après 24 h de gélification, les gels obtenus ont été déposés et collés dans une plaque P12 grâce à une goutte de chitosane sans AdC (*voir* Figure 2.7). Les dimensions des échantillons sont compilées dans le Tableau 2.4. Après avoir laissé la plaque P12 dans un bain-marie à 37 °C durant un autre 24 heures pour s'assurer que les gels étaient bien collés au fond des puits, une tomodensitométrie (CT scan) de la plaque a été réalisée (*voir* Figure 2.7).

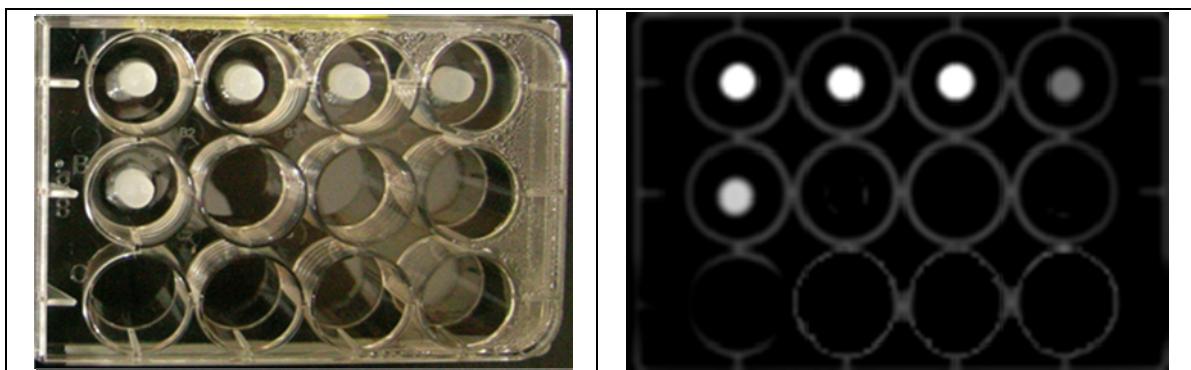


Figure 2.7 Disposition des échantillons dans une plaque P12 pour les essais CT scan et exemple de résultat tomodensitométrique

Tableau 2.4 Paramètres des échantillons testés lors du CT scan

Paramètre	Valeur
Diamètre	0,90 cm
Hauteur	0,79 cm
Surface exposée au milieu	2,86 cm ²
Volume de l'échantillon	0,5 ml
Volume de l'extrait	3,0 ml
Rapport surface exposée/volume d'extrait	0,95 cm ² /ml
Concentration finale max. en AdC dans le gel et la solution	2,9 % v/v

2.4.2 Le relargage de l'agent radio-opaque

Les échantillons ayant été produits et mis dans des plaques P12 tel que décrit précédemment, ils ont été immergés dans 3 ml de solution saline (0,9% w/v of NaCl, 300 mOsm/L) pour caractériser la vitesse de relargage des AdC. La plaque a ensuite été brassée à l'aide d'une plaque gyroscopique G2 Gyrotory shaker (New Brunswick Scientific inc., NJ, USA) ajustée pour tourner à 100 rpm selon des temps d'expositions prédéterminés (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 heures). Le relargage de l'AdC a été caractérisé en fonction des unités Hounsfield des gels à chaque temps d'exposition.

2.5 Microscopie électronique à balayage

La microstructure des hydrogels a été observée grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette information a été utilisée afin de mieux comprendre la relation entre l'utilisation d'AdC dans le gel de chitosane et la modification de la résistance mécanique et de la vitesse de relargage de cet agent. Dans des eppendorfs de 1,5 ml, des aliquotes de 0,5 ml des différentes formulations ont été gélifiés dans un incubateur (37 °C / 5 % CO₂) pendant 7 jours. Suite à cette période, les gels ont été lyophilisés sous vacuum avec un SpeedVac SC100 (Savant system, Holbrook, NY, USA) à -20 °C pendant 48 heures. Une fois les gels déshydratés, les échantillons ont été préparés en faisant une coupe transverse de

la structure tridimensionnelle à l'aide d'un scalpel suivie par l'application d'une mince couche d'or par projection. Des photos de la morphologie du réseau polymérique de chitosane ont été captées à l'aide d'un microscope électronique à balayage SU-70 (Hitachi Itée, Tokyo, Japon) situé au département de génie mécanique de l'ETS (École de technologie supérieure). Pour deux échantillons, une coupe sagittale a permis d'obtenir de meilleurs résultats.

2.6 La cytotoxicité indirecte par extrait

Les AdC pouvant être toxiques, des essais de cytotoxicité indirecte ont été complétés afin de déterminer le potentiel de toxicité des produits de relargages du gel. Les tests ont été accomplis en respectant les normes ISO 10993-5 : 2001 concernant les tests de cytotoxicité par extrait (Association canadienne de normalisation et Organisation internationale de normalisation, 2001).

Les cellules L929 (fibroblastes de souris) ont été cultivées dans un milieu de culture Dulbecco's Modified Medium / mélange de nutriment F-12 Ham's Media (DMEF/F12 ; Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplémenté avec du sérum fœtal de veau 10 % (FCS ; Medicor, Montréal, QC, CA) et 1 % Glutamine (PS, Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

Pour produire les extraits, 1 ml de chitosane provenant de chacune des formulations a été injecté dans un puits d'une plaque P12 (surface des puits : 4,16 cm²) et gélifié pendant 24 h dans un incubateur à 37 °C avec 5 % CO₂. Après gélification, 3 ml de milieu de culture avec sérum ont été ajoutés dans chacun des puits. Le ratio surface exposé/volume (1,4 cm²/ml) a été choisi en concordance avec la norme ISO 10993 : 5. Chaque 24 h, le milieu de culture était récupéré, entreposé à -20 °C et remplacé par du nouveau milieu de culture. Cette opération a été répétée durant une (1) semaine. Une partie de l'extrait a été utilisé pour compléter les essais cytotoxiques (5 échantillons testés/extrait) et une autre pour déterminer

l'osmolalité des solutions, puisqu'une forte tonicité des milieux est reconnue comme pouvant induire la mort cellulaire (Ahmadi et Bruijn, 2008).

Pour accomplir les essais de cytotoxicité, les cellules ont été ensemencées dans une plaque à 96 puits (P96) à une concentration de 10^5 cellules par puits. Elles ont été cultivées jusqu'à ce qu'elles atteignent 80 % de confluence. Le milieu de culture était alors retiré et remplacé par du milieu de culture contenant les extraits réchauffés préalablement à 37 °C au bain-marie. Les cellules ont été exposées pendant 24 h. Du milieu de culture n'ayant pas été exposé au gel a servi de témoin positif alors que du PBS (tampon phosphate salin) a été utilisé comme témoin négatif.

L'évaluation de la viabilité cellulaire a été accomplie en fluorescence à l'aide d'une trousse de viabilité cellulaire Resazurin Fluorometric Cell Viability Kit (AlamarBlue®, Cedarlane corp., Burlington, ON, CA). La molécule d'AlamarBlue est métabolisée par les cellules vivantes, ce qui lui permet d'émettre une fluorescence : après avoir été excitée à une longueur d'onde entre 530-560 nm (absorbance), la molécule émet une fluorescence à 590 nm. Les molécules non métabolisées ne peuvent pas émettre même si elles ont été excitées. La fluorescence normalisée a été établie en fonction de la fluorescence du contrôle positif, ce qui permet d'estimer le pourcentage de cellules vivantes. L'expérience a été répétée en triplicata.

2.7 Osmolalité

L'évaluation de l'osmolalité permet de vérifier l'existence d'une relation entre la tonicité connue des AdC et la tonicité et la cytotoxicité des produits relargués par les gels dans les extraits. Les extraits provenant des tests de cytotoxicité (24 et 48 h) ont été récupérés et testés avec un osmomètre Advanced™ Micro Osmometer Model 3300 (Advanced Instruments inc., Norwood, MA, USA) au laboratoire du département de chimie de l'UQAM (Université du Québec à Montréal). Cet appareil utilise le point de congélation pour déterminer la quantité d'osmole (nombre en mole de molécules ioniques et d'ions en solution) présente dans un

échantillon en sachant que la température de congélation diminue avec une augmentation du nombre d'osmoles. Le volume d'échantillon par test était de 20 μ L. L'expérience a été répétée en triplicata.

2.8 Analyse statistique

Les résultats présentés correspondent à des moyennes \pm un écart-type. Ils ont été modélisés en utilisant une analyse de variance ANOVA à simple facteur suivi d'un test post hoc de Fisher avec un intervalle de confiance à 95 % pour conclure à une différence significative entre les groupes.

Il est important de mentionner que contrairement au chitosane de DDA à 82,8%, les essais avec le chitosane de DDA à 94,4% ont été généralement trop peu nombreux pour permettre une analyse statistique.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Crédit des solutions thermodépendantes

La formulation de solution de chitosane incorporant des AdC, dans des concentrations variées, n'a pas empêché la gélification à la température physiologique, peu importe le DDA du chitosane utilisé. Le pH de tous les mélanges CH/AdC/βGP se situe au niveau physiologique (*voir* Tableau 3.1) et les solutions possèdent toujours un comportement gélifiant à 37 °C, comme le montre l'évolution du module G' dans le temps à la Figure 3.1. Cependant, cette même figure montre qu'il y a une modification dans la cinétique de gélification des solutions avec les AdC, mais aussi avec un changement de DDA. Dans les sections suivantes, il sera discuté des impacts que les AdC engendrent sur les propriétés de la solution et du gel de chitosane.

Tableau 3.1 pH des solutions de chitosane et d'AdC (CH/AdC) et des solutions de chitosan, βGP et AdC (CH/AdC/βGP)

	Chitosane DDA : 82,8 %		Chitosane DDA : 94,4 %	
	Solution CH/AdC	Solution CH/AdC/βGP	Solution CH/AdC	Solution CH/AdC/βGP
CH	6,1	7,2	6,1	7,2
CH ISO 10	6,0	7,2	6,0	7,2
CH ISO 20	6,0	7,2	6,0	7,2
CH ISO 30	6,0	7,2	6,0	7,2
CH VIS 20	6,0	7,2	6,0	7,2
CH CNR 20	6,3*	7,2	6,3*	7,2

* représente une différence significative lorsque comparé à toutes les autres formulations d'un même DDA (p<0,05)

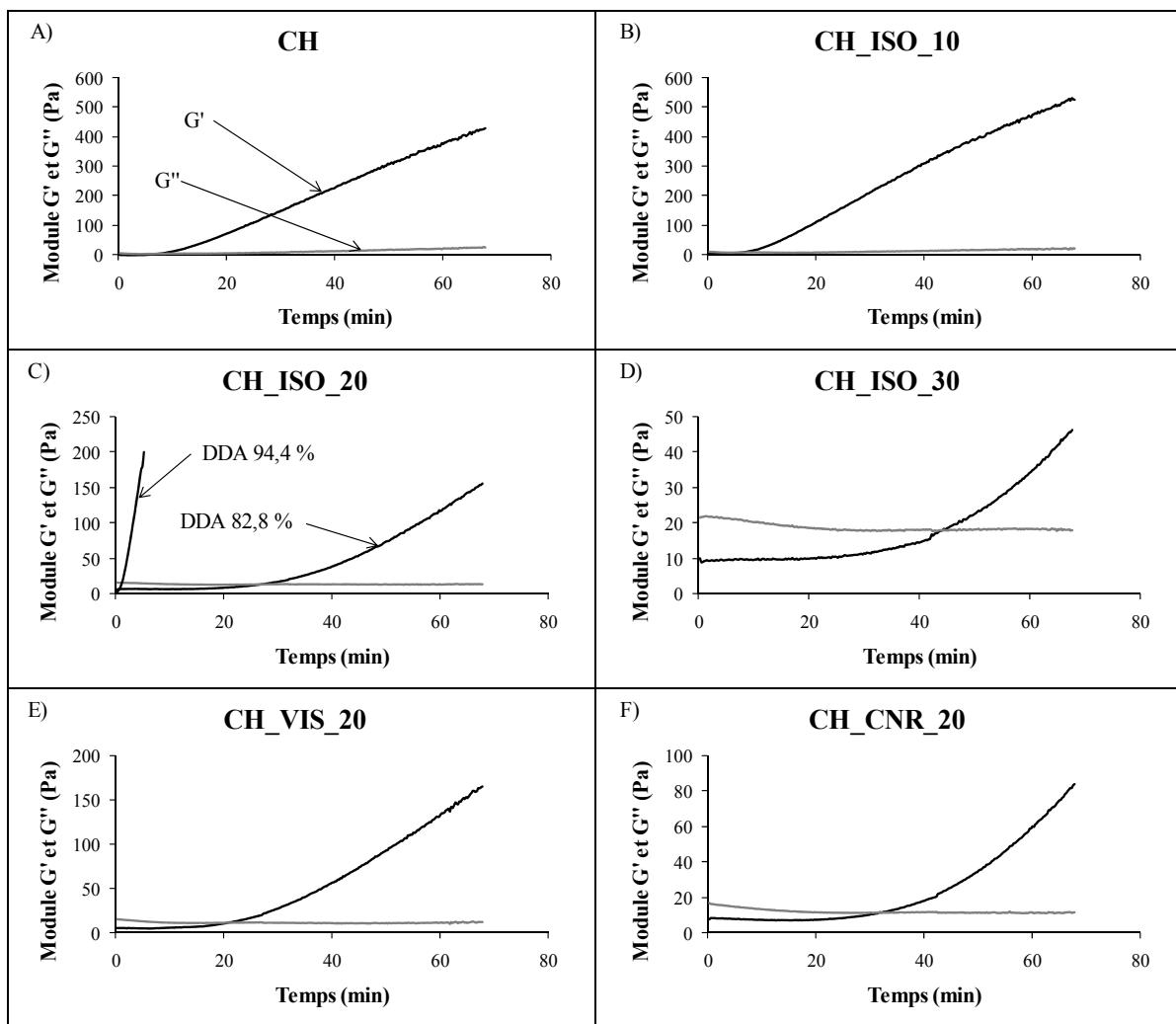


Figure 3.1 Évolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') à 37 °C des solutions de chitosane (DDA : 82,8 %) sans AdC (A), 10 % (B), 20 % (C), 30 % d'Isovue® (D), 20 % en Visipaque® (E) et 20 % en Conray® (F). La courbe de gélification avec le chitosane de DDA 94,4% avec 20% v/v en Isovue® est également présentée (C)

3.2 Viscosité des solutions

L'étude montre que la viscosité initiale de la solution (valeur de η^* après mélange des ingrédients) augmente de façon proportionnelle à la concentration en Isovue®. Alors qu'une solution de chitosane (DDA : 82,8 %) affiche une viscosité de 0,85 Pa.s, elle double, triple et quadruple avec 10, 20 et 30 % v/v en Isovue® respectivement (voir Figure 3.2A). Il y a une différence significative entre toutes les formulations (DDA 82,8 %, $p < 0,05$).

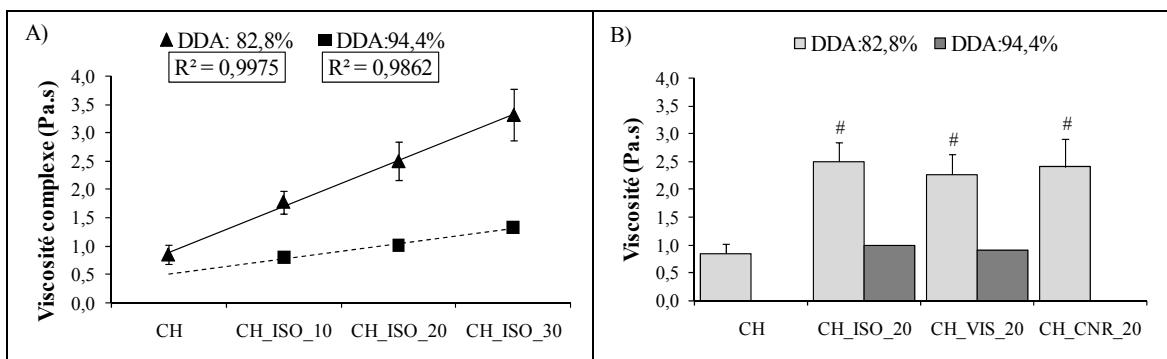


Figure 3.2 Viscosité des solutions (DDA 82,8 % et 94,4 %) en fonction A) de la concentration en Isovue®. (Il y a une différence significative entre toutes les formulations pour DDA 82,8 % ; $p<0,05$) et B) du type d'AdC. # différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$)

La viscosité des solutions de chitosane est faiblement influencée par le type d'AdC. Quoiqu'elles possèdent une différence significative avec le contrôle (CH, DDA 82,8 %), les valeurs de viscosité des formulations composées de Visipaque® et de Conray® ne sont pas significativement différentes de celle de l'Isovue® ($p= 0,48$ et $0,77$ respectivement) (voir Figure 3.2B).

L'emploi de chitosane avec un DDA de 94,4 % réduit considérablement la viscosité observée tout en présentant la même tendance, quoique nettement moins marquée (essais préliminaires, $n = 2$). Cette information confirme qu'il est possible d'optimiser la viscosité des solutions de chitosane pour en faire un bon agent embolisant. La viscosité n'a pu être déterminée pour la solution sans AdC et celle composée de Conray®, car elles étaient gélifiées avant l'acquisition de données.

3.3 Temps de gélification et modules à la gélification

La Figure 3.3A représente l'influence de la concentration en Isovue® sur le temps de gélification de la solution de chitosane. L'ajout d'AdC tend à augmenter le temps de gélification de façon exponentielle (DDA de 82,8 %). Il n'y a pas de différence significative entre la formulation sans AdC et celle composée de 10 % v/v en Isovue®. Par contre, le

temps de gélification croît nettement pour de plus fortes concentrations en Isovue® en triplant et quintuplant le temps de gélification pour 20 et 30 % v/v respectivement (DDA 82,8 %, $p<0,05$). En ce qui concerne la valeur des modules G' et G'' à la gélification, la tendance est similaire et quadruple pour une concentration de 30 % v/v (voir Figure 3.3B).

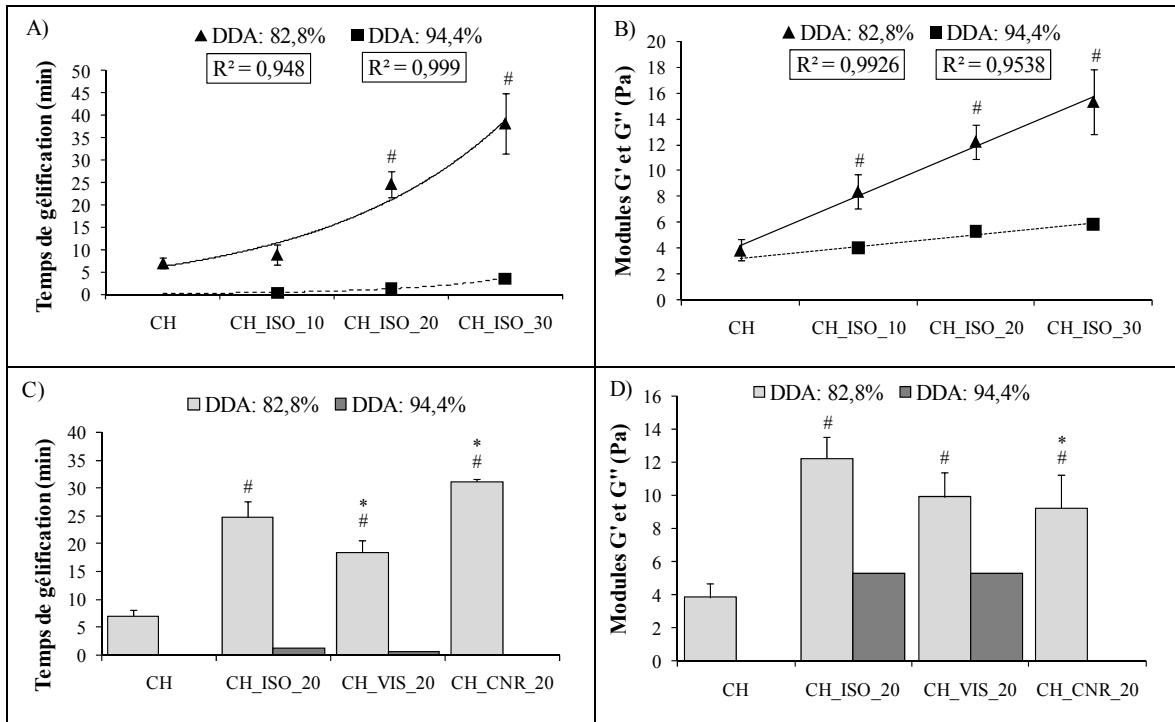


Figure 3.3 Temps de gélification ($G'=G''$) et valeurs des modules G' et G'' à la gélification en fonction de la concentration en Isovue® (A, B) et du type d'AdC (C, D) pour les 2 types de chitosane (DDA 82,8 % et 94,4 %). # : différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$) et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 (DDA 82,8 %, $p<0,05$)

La Figure 3.3C montre que les 3 types d'AdC augmentent le temps de gélification. Tandis que la solution de chitosane seule se gélifie au bout de 5 min, toutes les solutions composées de 20 % en AdC ont un temps supérieur à 18 min. Ces différences sont statistiquement significatives lorsque comparées au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$). Il y a aussi une différence statistiquement significative entre la solution composée d'Isovue® (24 min) et celles de Visipaque® (18 min) et de Conray® (31 min) (DDA 82,8 %, $p<0,05$). La valeur des modules à la gélification est généralement supérieure en présence d'AdC et proportionnelle

au temps de gélification, sauf dans le cas de la solution composée de Conray® (voir Figure 3.3D).

L'emploi du chitosane fortement désacétylé (DDA ~94,4 %) réduit considérablement le temps de gélification et les modules à la gélification (essai préliminaire, n = 2). Ce résultat permet d'entrevoir la possibilité d'optimiser ce critère pour l'élaboration d'une solution embolisante. Bien que préliminaires, ces données montrent un effet beaucoup plus limité des AdC avec le chitosane de DDA de 94,4 %. Le temps de gélification et les modules à la gélification n'ont pu être déterminés pour la solution sans AdC et celle composée de Conray®, car elles étaient gélifiées avant l'acquisition de données.

3.4 Vitesse de gélification

Tel que montré à la Figure 3.4A, en plus de retarder la gélification, l'ajout d'AdC diminue drastiquement la vitesse de gélification. À une concentration de 20 % en Isovue®, la vitesse est réduite de moitié et présente une différence significative avec le contrôle CH (DDA 82,8 %, p<0,05). Tous les AdC à une concentration de 20 % ont une différence significative avec le contrôle CH et cet effet est encore plus marquant pour le Conray® dont la diminution est significativement plus forte comparativement à la solution CH_ISO_20 (DDA 82,8 %, p<0,05) (voir Figure 3.4B).

Les résultats présentés aux Figure 3.4C et D montrent cependant qu'il est possible d'améliorer et de multiplier par dix (10) la vitesse de gélification en utilisant un chitosane de DDA à 94,4 % (résultats préliminaires, n = 2). Jumelée à l'effet sur le temps de gélification et la valeur des modules à la gélification, une modification du DDA du chitosane utilisé semble être un bon moyen d'optimiser la solution.

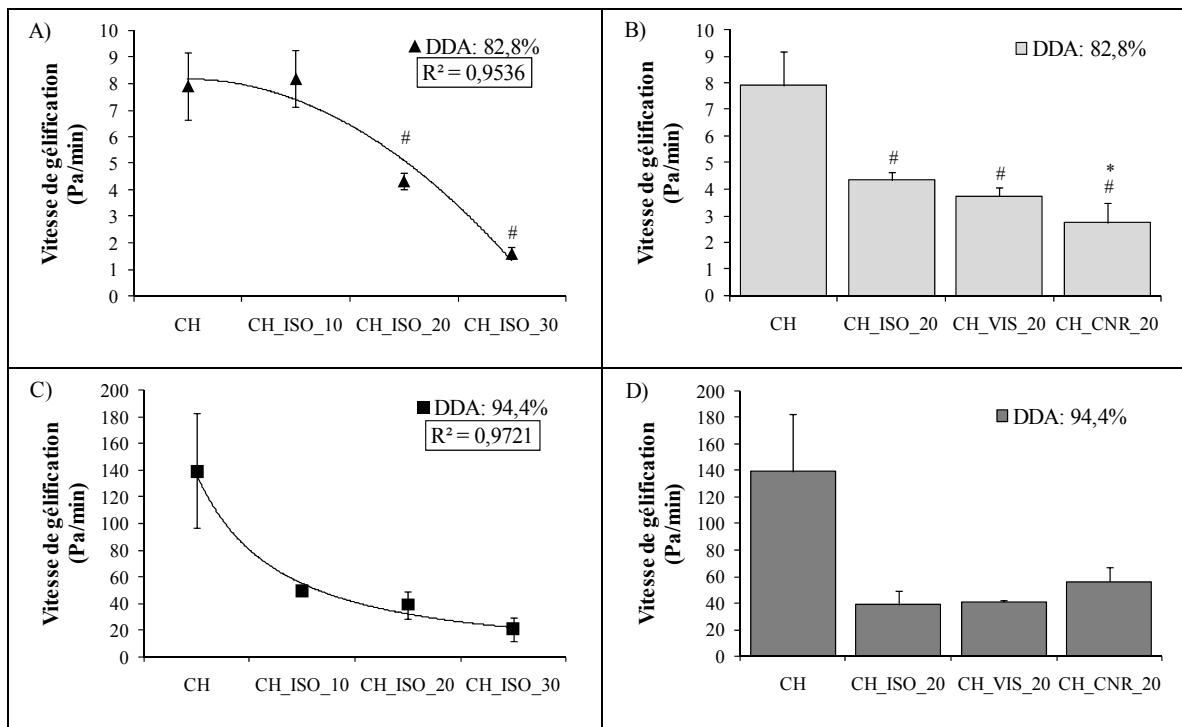


Figure 3.4 Pente de gélification des solutions de chitosane de DDA 82,8% et 94,4% en fonction de la concentration en Isovue® (A, C) et du type d'AdC (B, D). # représente une différence significative par rapport au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$) et * par rapport à la solution CH_ISO_20 (DDA 82,8 %, $p<0,05$)

3.5 Les propriétés mécaniques des gels après 1 semaine de gélification à 37 °C

3.5.1 Module de conservation (G') des gels

L'ajout d'AdC dans la solution de chitosane ne semble pas produire une modification notable de la résistance en cisaillement des hydrogels. Malgré deux exceptions, le module de conservation est approximativement de 1,5 kPa peu importe la concentration, le type d'AdC ou le DDA du chitosane utilisé (*voir* Figure 3.5 A et B). L'analyse statistique confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre les formulations (DDA de 82,8%).

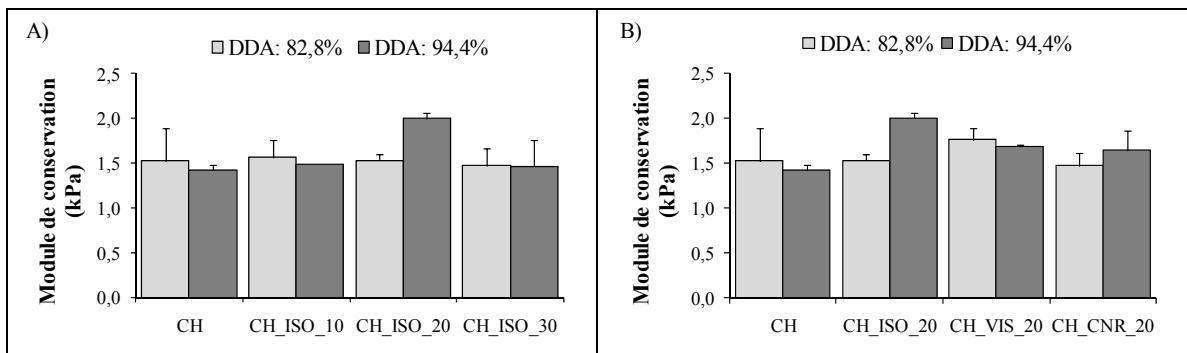


Figure 3.5 Module de conservation (G') après 1 semaine de gélification des solutions (DDA 82,8 % et 94,4 %) en fonction de A) de la concentration en Isovue® et B) du type d'AdC

3.5.2 Module sécant en compression des gels

Pour estimer le comportement que le gel aurait sous pression sanguine, le module sécant en compression a été caractérisé pour chaque formulation. L'obtention d'un faible module sécant suggèrera une forte déformation du gel sous pression sanguine risquant l'infiltration du sang et l'apparition d'endofuites dans le sac anévrismal. L'hypothèse selon laquelle l'ajout d'AdC dans la solution de chitosane peut modifier certaines propriétés du chitosane nous laisse croire que le comportement sous contrainte du gel peut varier en fonction de la concentration et du type d'AdC utilisé.

Le module sécant en compression, (voir Figure 3.6A) évolue de façon non linéaire en fonction de la déformation et s'accentue lorsqu'on augmente la concentration en Isovue®. Selon la formulation et la déformation étudiée, le module sécant oscille entre 3 et 8 kPa et reste relativement faible comparativement à la pression sanguine (120 mm Hg/16 kPa en moyenne) suggérant qu'il risque de se déformer fortement dans le contexte des AAA. Les différences obtenues sont significatives pour chacune des formulations et déformations lorsque comparées au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$). Les résultats à la Figure 3.6B, montrent que le type d'AdC a une influence limitée sur le module sécant en compression puisqu'aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les gels composés d'Isovue®, de Visipaque® ou de Conray® 20% v/v.

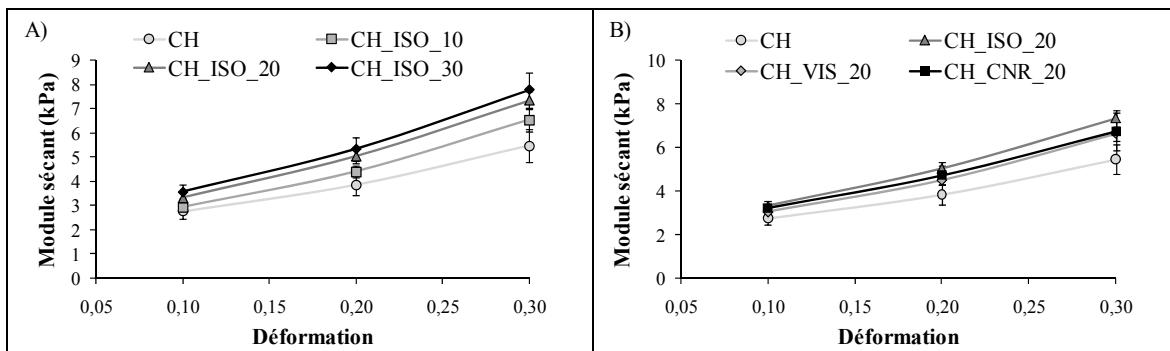


Figure 3.6 Module sécant en compression des gels (DDA 82,8 %) en fonction A) de la concentration en Isovue® ($p<0,05$ pour toutes les formulations à toutes les déformations par rapport au contrôle CH) et B) du type d'AdC. Il n'a y pas de différence significative entre les AdC testés

3.5.3 Dureté et perte de dureté des gels

Le test de « dureté » visait à faire une comparaison des propriétés mécaniques du gel de chitosane avec l'alginate de calcium et permettait du même coup de connaître la résistance du réseau de chitosane, d'AdC et de βGP et la détérioration du gel face à la pression sanguine. Dans l'étude actuelle, on a considéré que la dureté correspondait à la contrainte nécessaire pour déformer de 40 % le gel. Cette déformation a été choisie en fonction des articles consultés sur l'alginate de calcium (Becker, Kipke et Brandon, 2001; Lee *et al.*, 2009a).

La Figure 3.7A montre qu'il y a une augmentation de 40 % de la dureté (de 3,04 à 4,25 kPa) en augmentant la concentration en Isovue® de 0 à 30 % v/v. Les différences sont statistiquement significatives pour toutes les concentrations testées comparativement au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$). La dureté diminue pour tous les gels après la première compression et la perte de dureté oscille de façon non significative entre 6 et 9 % selon la concentration étudiée (*voir* Figure 3.7B).

Le type d'AdC incorporé dans la solution de chitosane influence également, mais faiblement, la dureté du gel obtenu. Selon la Figure 3.7C, le gel composé de Conray® obtient une diminution statistiquement significative de 10 % de sa dureté comparativement à l'Isovue®

(3,65 contre 4,07 kPa) alors que la dureté du Visipaque® est semblable. Les gels avec AdC sont cependant tous légèrement plus durs que celui sans AdC (DDA 82,8 %, $p<0,05$). La perte de dureté à la 2^e compression est faible (environ 7 %) sans différence significative entre les formulations ($p<0,05$) (voir Figure 3.7D).

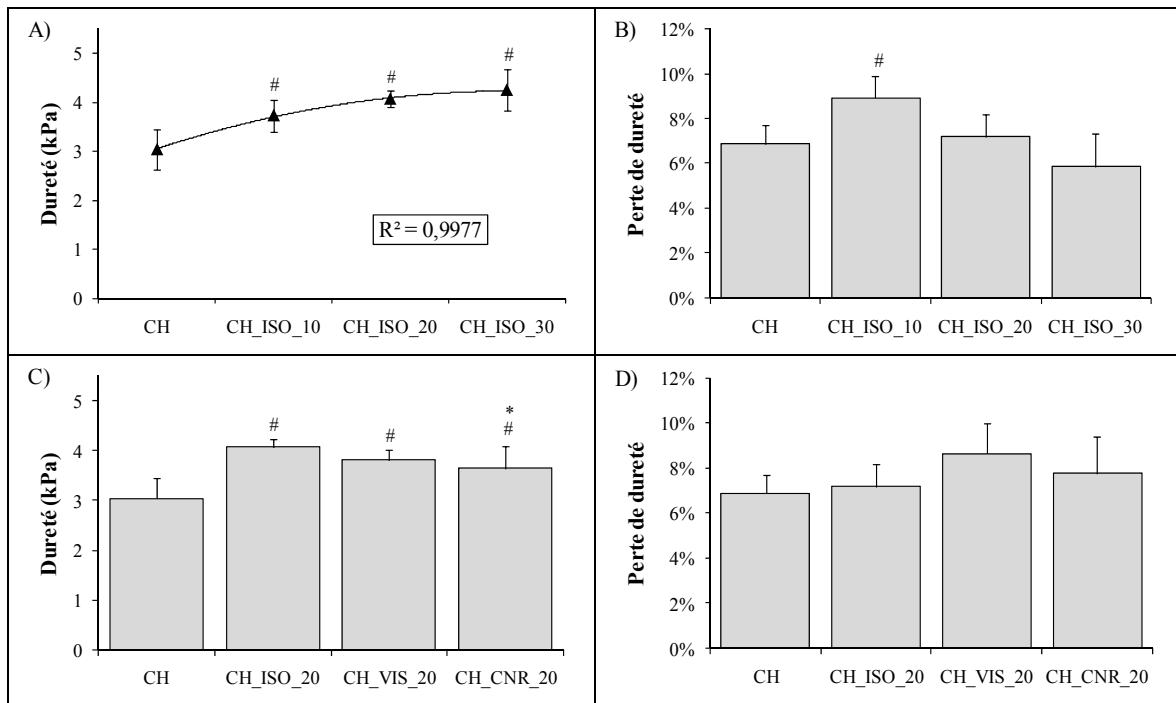


Figure 3.7 Dureté et perte de dureté entre la 1^{ère} et la 2^{nde} compression, en fonction de la concentration en Isovue® (A,B) et du type d'AdC (C,D) (DDA : 82,8 %) # différence significative avec le contrôle CH et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 ($p<0,05$)

3.5.4 Cohésion et perte de cohésion des gels

L'énergie de cohésion permet d'évaluer l'énergie nécessaire pour déformer la structure rigide de chitosane et la phase liquide composée d'eau, d'AdC et de β GP. En appliquant une deuxième déformation équivalente, il est alors possible de quantifier l'énergie irrécupérable relative à l'expulsion de l'AdC et au β GP du réseau tridimensionnel de chitosane. Ce point sera discuté de façon plus exhaustive dans la discussion.

De façon très similaire à la dureté, la concentration et le type d'AdC influencent l'énergie de cohésion (voir Figure 3.8). L'énergie nécessaire pour déformer de 40 % le gel se situe entre 33 et 49 mN.mm selon la composition du gel. À partir de 20 % v/v en AdC, il y a une différence statistiquement significative pour toutes les formulations, lorsque comparées au contrôle CH (DDA 82,8 %, $p<0,05$).

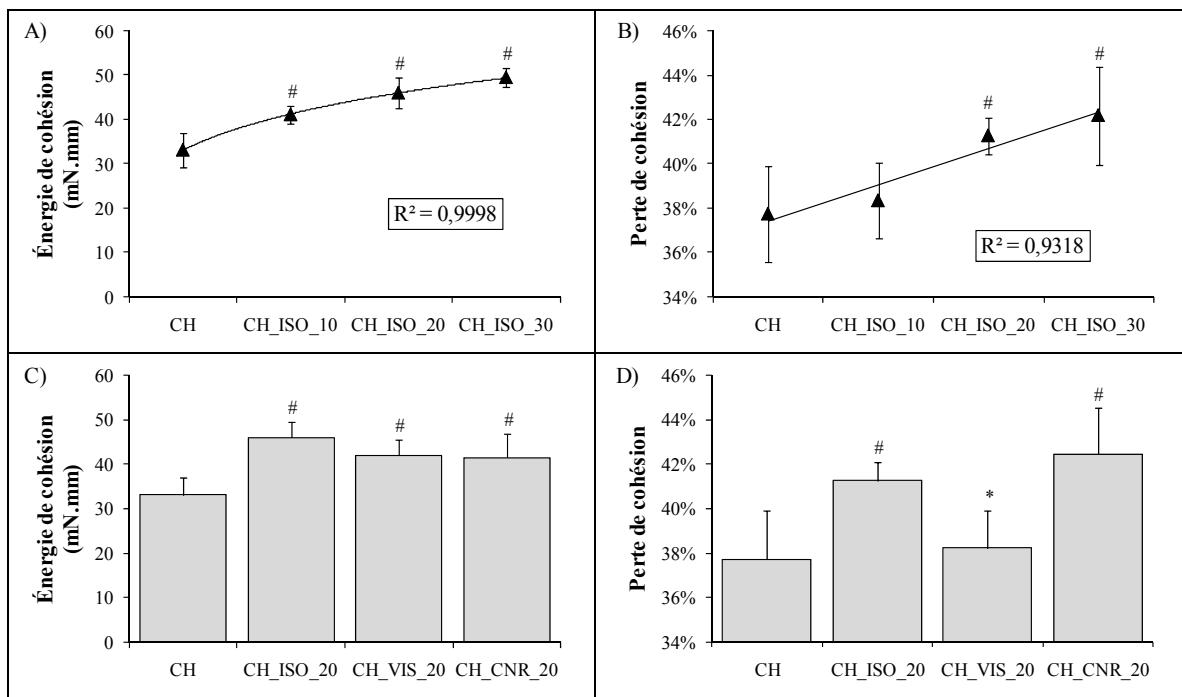


Figure 3.8 Énergie de cohésion et perte de cohésion entre la 1^{ère} et la 2^{nde} compression en fonction de la concentration en Isovue® (A, B) et du type d'AdC (C,D) (DDA 82,8 %).

différence significative par rapport au contrôle CH et * par rapport à la formulation CH_ISO_20 ($p<0,05$)

Suite à une première compression, l'énergie nécessaire pour produire la deuxième déformation est nettement inférieure, soit une diminution d'environ 40 % pour toutes les solutions. Cette perte de cohésion varie légèrement en fonction de la concentration et du type d'AdC étudié. Les gels les plus cohésifs obtiennent une perte de cohésion significativement plus importante que la formulation CH (formulations CH_ISO_20, CH_ISO_30 et CH_CNR_20, $p<0,05$), à l'exception de la formulation CH_VIS_20 ($p= 0,657$).

3.6 Radio-opacité des gels

La radio-opacité des gels produits lors de cette étude est un élément important dans le choix d'une formulation optimale. La radio-opacité permet de suivre le déploiement de la solution dans le sac anévrismal et de s'assurer qu'il n'y ait pas de migration de la solution dans le système cardiovasculaire. Pour déterminer la concentration en produit de contraste à étudier, un test préliminaire a servi de référence (*voir* Figure 3.9). Après discussion, une concentration d'environ 20 % v/v a été identifiée par le radiologue Dr Soulez comme étant une concentration permettant de faire les meilleurs compromis pour son utilisation comme agent embolisant.

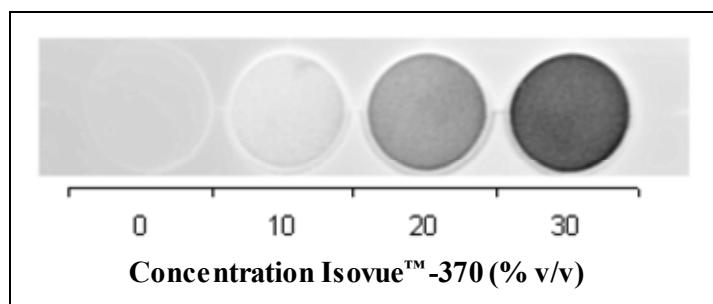


Figure 3.9 Test préliminaire pour déterminer la concentration en AdC (Isovue[®]) à étudier

Une fois que la concentration à étudier plus spécifiquement a été déterminée, une tomodensitométrie a été réalisée afin de quantifier la radio-opacité des gels de chitosane et comparer leurs unités Hounsfield (HU). Le nombre d'unités Hounsfield des différentes formulations composées de 20 % en AdC sont présentées dans le Tableau 3.2. Tel qu'attendu, les résultats corrélatifs avec la concentration équivalente en iodure dans chaque échantillon, calculée en fonction du volume d'AdC incorporé. Le gel produit avec de l'Isovue[®] s'avère le plus radio-opaque des trois formulations (*voir* Figure 3.10).

Tableau 3.2 Concentration en iode et densité Hounsfield des différents gels (DDA : 82,8 %) avec 0 ou 20 % v/v en AdC

Gel	Concentration en iode de l'AdC (mg I/ml)	Quantité équivalente d'iode dans l'échantillon (mg I)	Unités Hounsfield du gel (HU)
CH	-	0	152
CH_CNR_20	282	113	1577
CH_VIS_20	320	128	1932
CH ISO 20	370	148	2168

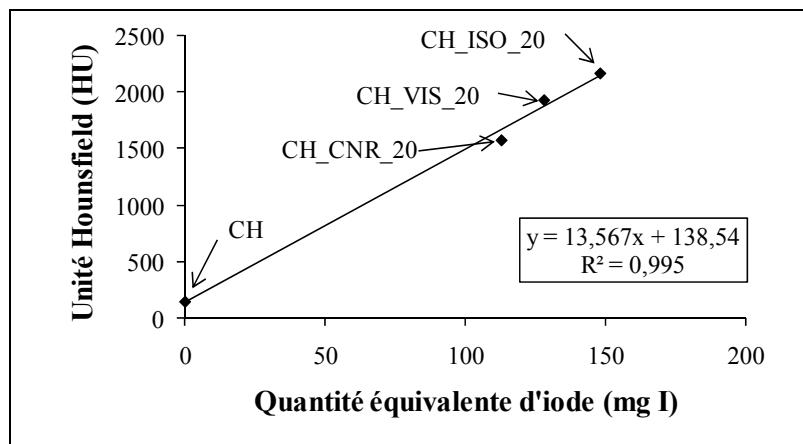


Figure 3.10 Unités Hounsfield des gels (DDA 82,8 %) en fonction du type d'AdC à une concentration de 0 ou 20 % v/v

3.7 Relargage de l'AdC

L'étude du relargage des produits de contraste a été réalisée grâce à une tomodensitométrie des gels suite à une exposition à une solution saline selon des délais de temps prédéfinis. Les résultats démontrent que les produits de contraste sont rapidement libérés des gels (*voir* Figure 3.11A). Tous, après environ 3 h, selon la densité Hounsfield normalisée à la densité initiale, ont perdu 50 % de leur radio-opacité (*voir* Figure 3.11B). Après 4 h, la densité Hounsfield normalisée des gels composés d'Isovue®, de Visipaque® et de Conray® atteint respectivement 32, 44 et 20 %.

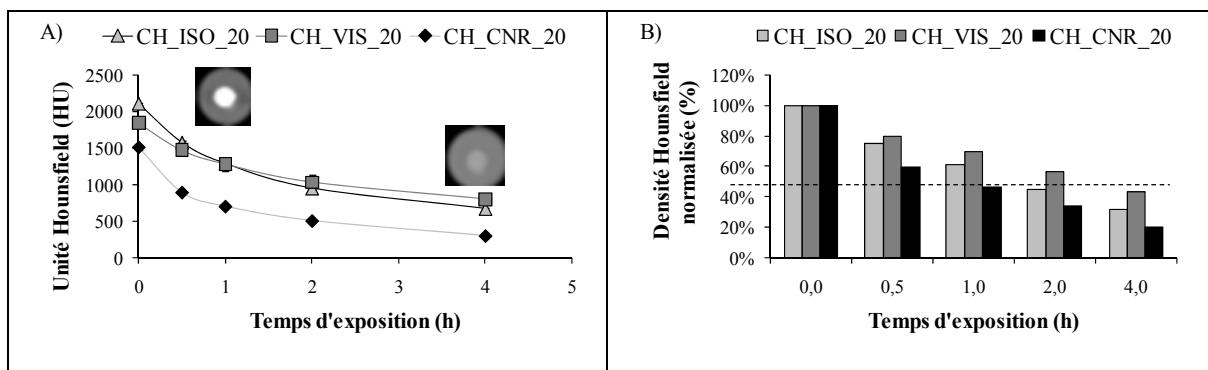


Figure 3.11 A) Unités Hounsfield en fonction du temps d'exposition à une solution saline et B) la perte de densité Hounsfield entre les intervalles d'expositions des gels (DDA : 82,8 %) avec 20 % v/v en AdC

3.8 Microscopie électronique à balayage

L'ajout d'Isovüe[®] dans la solution de chitosane modifie la morphologie de la structure tridimensionnelle du réseau polymérique du gel résultant. Alors qu'un gel sans AdC a des pores interconnectés relativement homogènes, la présence d'Isovüe[®] produit des pores hétérogènes et plus volumineux, qui finissent par être bouchés par l'AdC à de fortes concentrations (20 et 30 %) (*voir* Figure 3.12).

Le type d'AdC à une même concentration modifie différemment la microstructure des gels obtenus après gélification. À une concentration de 20 %, l'Isovüe[®] bouche les pores et en réduit la dimension alors que le Visipaque[®] et le Conray[®] modifient l'homogénéité de la structure polymérique créant des pores de grandeur variée (*voir* Figure 3.13). Toutefois, l'utilisation d'une autre technique permettant d'éliminer la perte d'intégrité des gels lors de la liophilisation obtenue avec la technique employée présentement serait importante pour confirmer ces résultats.

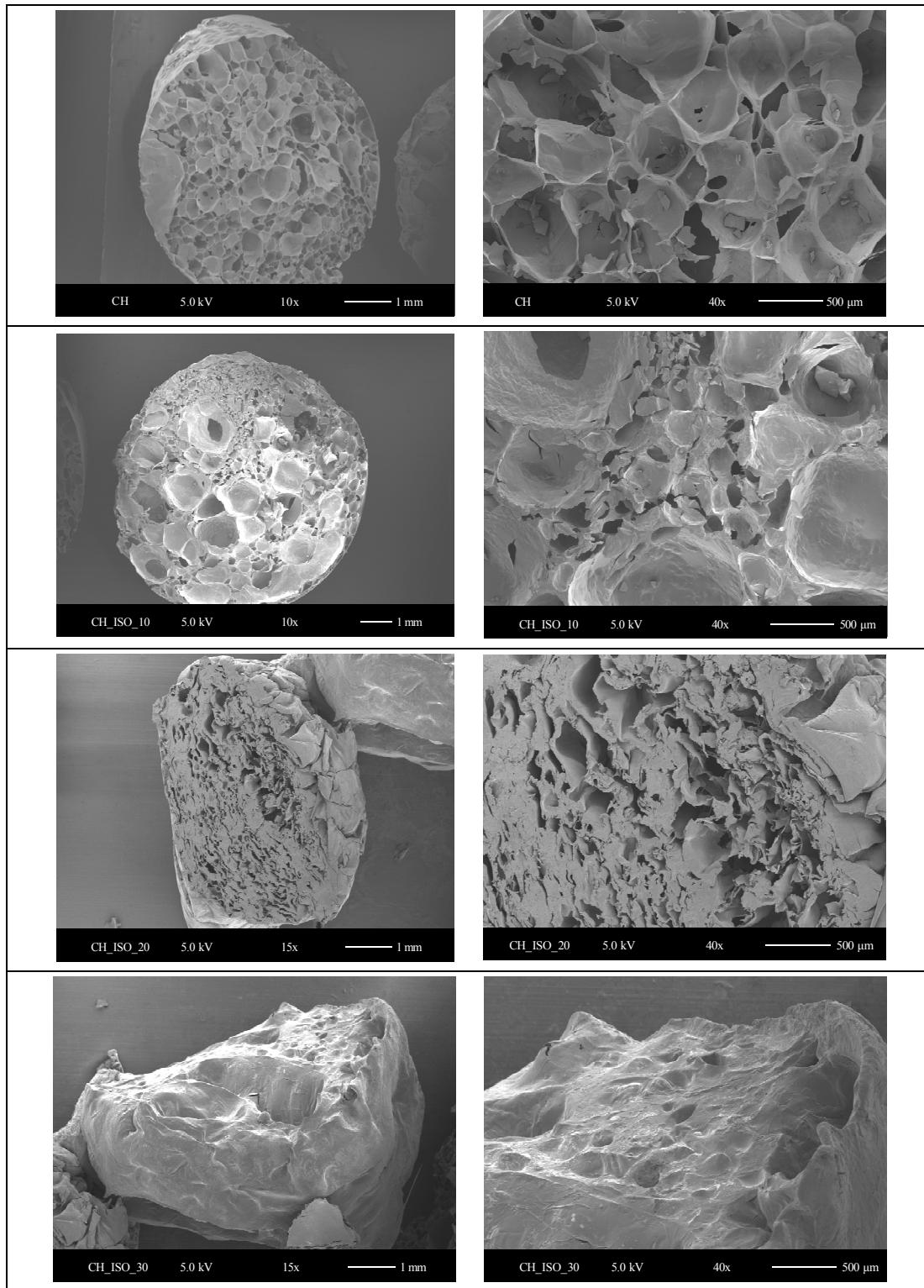


Figure 3.12 Images par MEB de la morphologie des gels (DDA 82,8 %) en fonction de la concentration en Isovue®

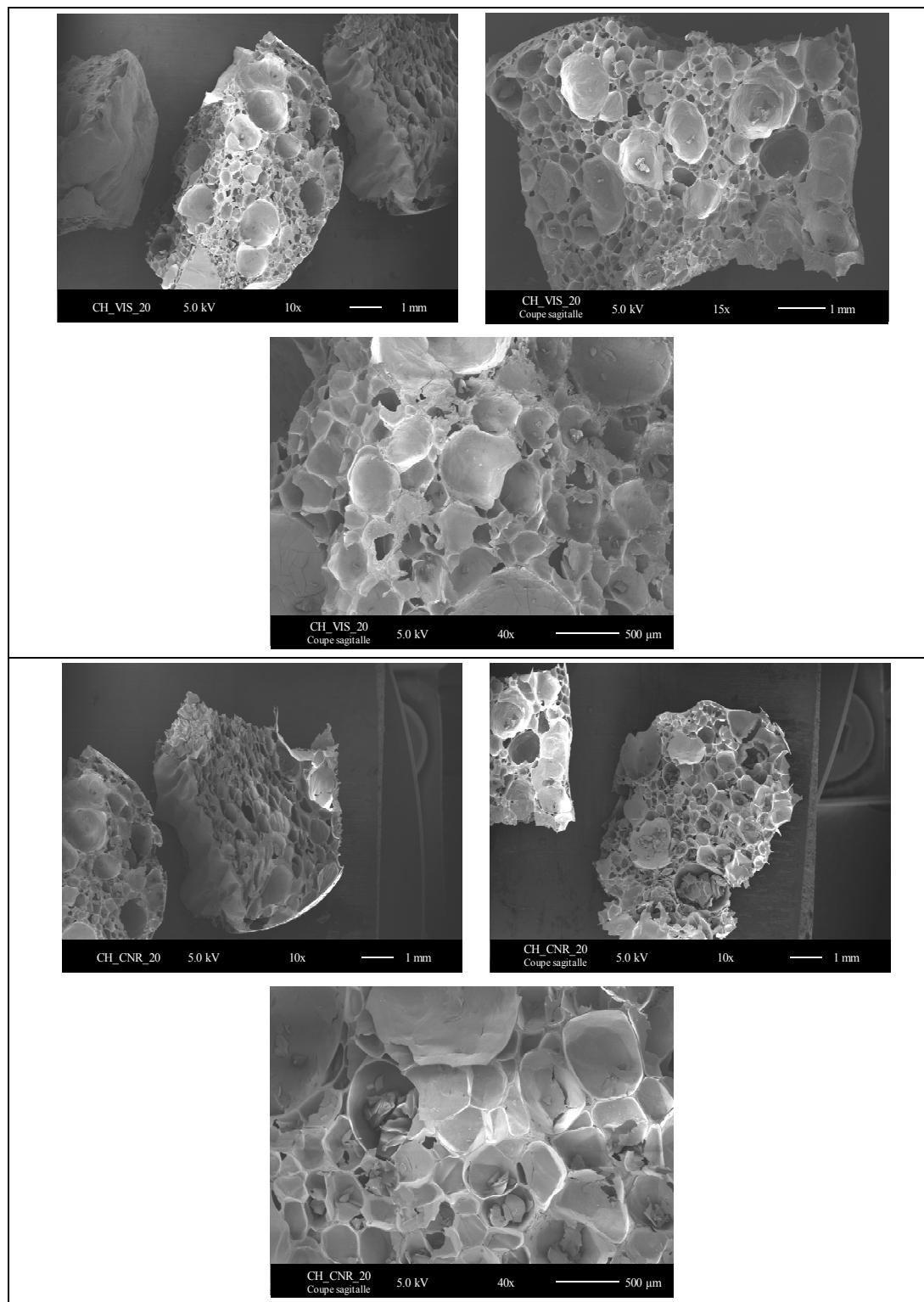


Figure 3.13 Images par MEB de la morphologie des gels (DDA 82,8 %) avec 20 % v/v en AdC en fonction du type d'AdC

3.9 Cytotoxicité et osmolalité

Les résultats d'essais de cytotoxicité indirects sont présentés à la Figure 3.14A. La viabilité cellulaire y est exprimée sous forme de pourcentage de fluorescence normalisé par rapport au contrôle correspondant aux cellules incubées dans du milieu de culture. L'extrait produit lors des 24 premières heures d'exposition du gel CH/βGP serait faiblement毒ique sur les fibroblastes L929 (6 %), tandis que ceux produits avec les gels composés d'AdC produisent tous une diminution statistiquement significative de la survie cellulaire (entre 23 et 38 %) (voir Figure 3.14A). Cependant, en comparant les résultats du Visipaque® avec ceux de l'Isovue®, le Visipaque® est statistiquement moins毒ique ($p<0,05$). Aucune toxicité n'est observée avec les extraits provenant du deuxième 24 h d'exposition.

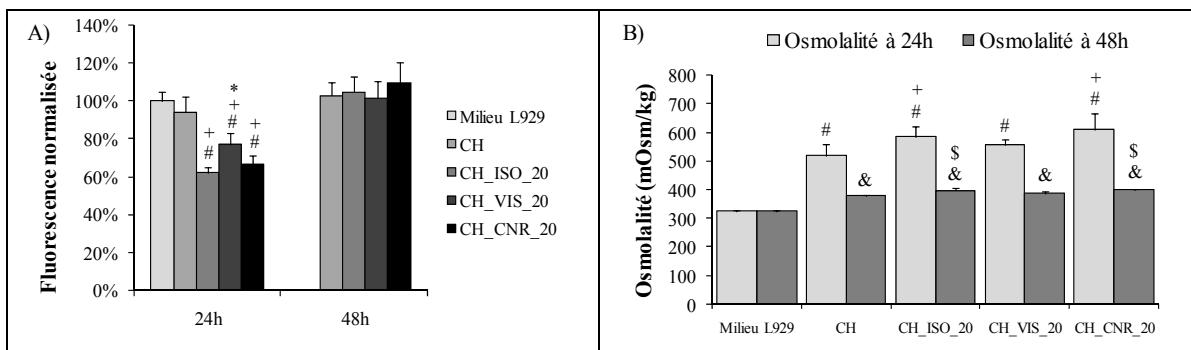


Figure 3.14 A) Viabilité cellulaire présentée sous forme de fluorescence normalisée lors des essais de cytotoxicité par extraits et B) osmolalité de ces extraits produits par l'incubation en milieu de culture des gels (DDA 82,8 %) sans ou avec 20 % v/v en AdC. # différence significative par rapport au milieu de culture (24 h), + par rapport à CH (24 h), * par rapport à CH_ISO_20 (24 h), & par rapport au milieu de culture (48 h) et \$ par rapport à CH (48 h) ($p<0,05$)

Sachant que les AdC ont des tonicités différentes, l'osmolalité des extraits a été caractérisée pour déterminer le possible rôle qu'elle pourrait avoir sur la survie cellulaire des L929. La Figure 3.14B présente l'osmolalité des extraits après le premier et le deuxième 24 h d'exposition aux gels. Tous les extraits présentent une osmolalité nettement supérieure au contrôle (milieu de culture L929) après 24 h, y compris les gels de chitosane sans AdC ($p<0,0001$). Tel qu'attendu, les extraits composés d'AdC hypertoniques (Isovue® et Conray®)

obtiennent des résultats statistiquement supérieurs à ceux produits avec les formulations sans AdC et le Visipaque®. Au deuxième 24 h d'exposition, l'osmolalité diminue à environ 400 mOsmol/kg pour tous les extraits produits à partir des gels de chitosane.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Il n'existe pas d'agent embolisant satisfaisant pour traiter et prévenir les endofuites après un traitement endovasculaire des anévrismes. Pour cette raison l'objectif de cette maîtrise consistait d'une part à évaluer le potentiel du thermogel de chitosane comme nouvel agent embolisant et, plus spécifiquement, à étudier l'influence de différents AdC, ionique ou non ionique, hypertonique ou isotonique, sur les propriétés déterminantes pour une telle application, soit la viscosité, le temps et la vitesse de gélification, les propriétés mécaniques une fois la solution gélifiée et la biocompatibilité de ce gel et des constituants relargués.

4.1 **Effet des AdC sur la gélification des thermogels**

4.1.1 **Viscosité des solutions**

La viscosité des solutions de chitosane avec AdC est un élément très important dans l'élaboration d'un agent embolisant. Dans le contexte d'une opération minimalement invasive qu'est l'EVAR, l'agent embolisant doit être injecté par cathéter au niveau du sac anévrismal. Une viscosité trop élevée pourrait limiter l'injectabilité via un cathéter de petit diamètre ou requérir une force importante pour l'injecter. À l'inverse, une faible viscosité ouvre la chance à la migration de l'agent embolisant dans le circuit cardiovasculaire et à l'embolisation non ciblée. Dans cette optique, bien comprendre l'influence des différents agents de contraste (ionique ou non-ionique, hypertonique ou isotonique) sur cette caractéristique était important.

La viscosité de la solution de chitosane avant gélification (environ 846 mPa.s) s'avère nettement supérieure aux autres produits embolisant existants. Comme on peut le voir au Tableau 4.1, les agents embolisant existants, tels que les produits composés d'acrylate et l'Onyx®, ne sont pratiquement pas visqueux lors de l'injection. Ceux-ci sont injectés à l'état

liquide et se polymérisent très rapidement une fois en contact avec le catalyseur ou avec le sang. Ils ont été conçus pour les vaisseaux de petits diamètres au niveau intracrânien. La haute viscosité des solutions de chitosane constitue un avantage pour les AAA, car elle permet une injection lente et contrôlée. Elle permet du même coup d'éviter une dilution de la solution par le sang, ce qui risquerait de réduire les propriétés mécaniques du gel (diminution de la concentration en chitosane).

L'ajout d'AdC augmente encore davantage la viscosité initiale des solutions de façon proportionnelle à la concentration d'AdC, ce qui constitue un avantage (*cf. section 3.2 : Viscosité des solutions*). Pour une concentration de 20 % v/v d'AdC, la viscosité est multipliée par 3 par rapport au CH (DDA 82,8 %) peu importe le type d'AdC, les différences étant minimes entre eux. Cette augmentation est cependant plus restreinte avec du chitosane à DDA de 94,4 %. Pour s'assurer que les solutions avec et sans AdC n'étaient pas trop visqueuses pour une injection par cathéter, des essais *in vitro* ont été accomplis avec succès en utilisant un cathéter 24G (0,511 mm de diamètre). Des études plus poussées évaluant la force d'injection selon le diamètre du cathéter et les propriétés mécaniques après injection seraient cependant souhaitable.

4.1.2 Temps et vitesse de gélification

Afin d'éviter l'embolisation non ciblée d'artères parentes lors de l'embolisation, il est également important de caractériser le temps de gélification de la solution injectée. L'évaluation du temps de gélification, évalué ici par le temps au bout duquel $G' = G''$, constitue un élément important dans l'élaboration d'un agent embolisant thermodépendant injectable.

Sur ce point, les formulations incorporant de l'AdC obtiennent des résultats sensiblement comparables à l'alginate de calcium qui constitue probablement le meilleur des produits comparatifs présentement testés pour les AAA (*voir Tableau 4.1*). L'Onyx® précipite et les acrylates (NBCA/ISCA) polymérisent trop rapidement pour leur utilisation dans l'anévrisme

de gros volume comme les AAA. Il est connu que ces deux produits ont tendance à faire une occlusion partielle de l'anévrisme, car, se durcissant trop rapidement, il devient difficile de faire une injection distale du produit. Pour les acrylates, il y a aussi le risque de coller le cathéter à l'artère risquant d'entraîner des complications sérieuses (Becker *et al.*, 2005; Buckenham *et al.*, 2009; Loh et Duckwiler, 2010).

Dans le cas du thermogel de chitosane étudié ici (DDA 82,8 %), le temps de gélification est de plus de 5 min et semble légèrement élevé pour notre application. De plus, une augmentation assez prononcée du temps de gélification a été observée en présence d'AdC, qui croît avec la concentration, atteignant un t_{gel} supérieur à 15 minutes avec l'incorporation de plus de 10 % v/v d'AdC (*voir* Figure 3.3A et C). Des différences ont été observées entre les 3 générations d'AdC, mais elles ne devraient pas être significatives d'un point de vue clinique.

Pour un agent embolisant thermogélifiant, le temps de gélification est un élément comparatif, mais pas nécessairement limitant, puisqu'il est possible de faire un préchauffage de la solution avant l'injection chez le patient pour éviter le temps de latence. Il faut surtout évaluer la vitesse de gélification, soit la vitesse à laquelle les propriétés mécaniques du gel augmentent une fois que la gélification commence. En effet, il est préférable qu'elle soit élevée pour s'assurer que l'hydrogel puisse résister aux sollicitations le plus rapidement possible afin d'éviter qu'il ne se fragmente et migre dans le réseau cardiovasculaire. Or, la pente de gélification du thermogel de chitosane étudié (DDA 82,8 %) est beaucoup trop lente (≈ 8 Pa/min). De plus, elle est réduite par l'ajout d'AdC, ce qui constitue une limitation pour notre thermogel (*voir* Figure 3.4B). Il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues à celles des autres agents embolisants existants, car il n'y a pas de données à ce sujet.

Tableau 4.1 Propriétés des agents embolisant existants et celles du gel de chitosane (DDA 82,8 %) obtenues durant cette étude

Agent embolisant	Viscosité (mPa.s)	Temps de gélification / polymérisation / précipitation	Propriétés mécaniques (kPa)		
			Module G' en cisaillement	Module secant en compression (déformation 30 %)	Dureté à 40 % de déformation
CHβGP	CH	850 (N/A)	7 (N/A) min	1,5	5,5 6,6 ^k
	CH ISO 10	1780 (790)	9 (0,4) min	1,6	6,5
	CH ISO 20	2490 (1000)	25 (1,3) min	1,5	7,3
	CH ISO 30	3310 (1320)	38 (3,5) min	1,5	4,1
	CH VIS 20	2270 (901)	18 (0,7) min	1,8	4,3
	CH CNR 20	2400 (N/A)	31 (N/A) min	1,5	6,6 6,7
NBCA / ISCA		3,1-7,4 ^a	NBCA : 0,1 s ^a ISCA : 8 s ^a	-	-
Onyx[®]	Onyx [®] 18	18 ^{b,c}	Env. 1-2 min ^e	-	-
	Onyx [®] 20	20 ^b	Env. 1-2 min ^e	-	-
	Onyx [®] 34	34 ^b	Env. 1-2 min ^e	-	-
	Onyx [®] HD 500	500 ^d	3 min	-	-
Alginate de calcium		27-563 ^f 1,9-367 ^g 80-150 ^h	18-120 min ⁱ	10-40 ^{h,j}	40-800 ^{i,j} 10-41 ^f 21-77 ^g 30-80 ^{h,j}

Les résultats entre parenthèses sont ceux obtenus pour un DDA de 94,4%

^a(Owaki *et al.*, 2000); ^b(Quireshi, 2011); ^c(Horvathy *et al.*, 2011); ^d(Ayad, Eskioglu et Mericle, 2006); ^e(van Rooij, Sluzewski et Beute, 2007);^f(Becker, Kipke et Brandon, 2001); ^g(Lee *et al.*, 2009a); ^h(Becker *et al.*, 2005); ⁱ(Kuo et Ma, 2001); ^jManque d'information quant à la technique utilisée ou les paramètres d'essai; ^kVitesse de sollicitation à 1200 %/min, module secant à 10 % de déformation (Wang et Siegmann, 2010b)

Point intéressant, il est cependant possible d'améliorer le temps et la vitesse de gélification en modifiant le DDA du chitosane d'après la littérature et les essais préliminaires. Ainsi, dans notre étude, le chitosane de DDA 94,4 % avec une concentration de 20 % v/v en AdC obtient des temps de gélification nettement plus courts (moins de 2 min, *voir* Figure 3.3C) et une vitesse de gélification en moyenne 10 fois supérieure à celui ayant un DDA de 82,8 % (\approx 40 Pa/min, *voir* Figure 3.4D). Les propriétés de gélification obtenues avec le chitosane de DDA 94,4 % semblent très appropriées pour cette application.

On remarque cependant que l'effet des différents AdC sur le chitosane 94,4% ne suit pas la même tendance que celle observée avec un DDA 82,8%, dans le sens que l'Isovue[®] obtient des résultats contraires ; il prend plus de temps pour se gélifier et il gélifie moins vite. Ceci mériteraient des expériences complémentaires. De plus, on sait qu'augmenter le DDA du chitosane diminue sa biodégradation et devrait ainsi augmenter le temps de résidence du gel *in vivo* (Chenite *et al.*, 2000; Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007; Rinaudo, 2007; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000). La vitesse de biodégradation pourrait toutefois être ajustée en modifiant la Mw du chitosane en fonction des besoins (Ganji, Abdekhodaie et Ramazani S.A, 2007).

4.2 Mécanismes expliquant l'effet des AdC sur le comportement de la solution

Si on résume l'effet des AdC sur les propriétés viscoélastiques des thermogels de chitosane, l'ajout d'AdC augmente de façon importante la viscosité du produit, le temps de gélification et réduit significativement la vitesse de gélification. Cet effet augmente avec la concentration, et même si certaines différences significatives ont été observées entre les différents AdC, aucune ne semble vraiment être significative sur le plan pratique (clinique) quelque soit le DDA utilisé à une concentration de 20 % v/v d'AdC. Cependant, il est intéressant de noter que, malgré qu'ils soient incomplets, les résultats avec le chitosane de DDA 94,4 % semblent démontrer une forte diminution de la vitesse de gélification comparativement au chitosane de 82,8 % DDA, mais avec une influence plus faible des AdC.

Les principaux facteurs qui modifient les comportements des solutions de chitosane incorporant un AdC sont l'accrochage et la friction entre les molécules la constituant, la modification de la force ionique et la création de liaison ionique (*voir* Figure 4.1). Ces facteurs sont détaillés ci-après pour en comprendre les mécanismes, même si l'importance relative de chacun dans les modifications observées lors de l'ajout d'AdC ne peut être déduite.

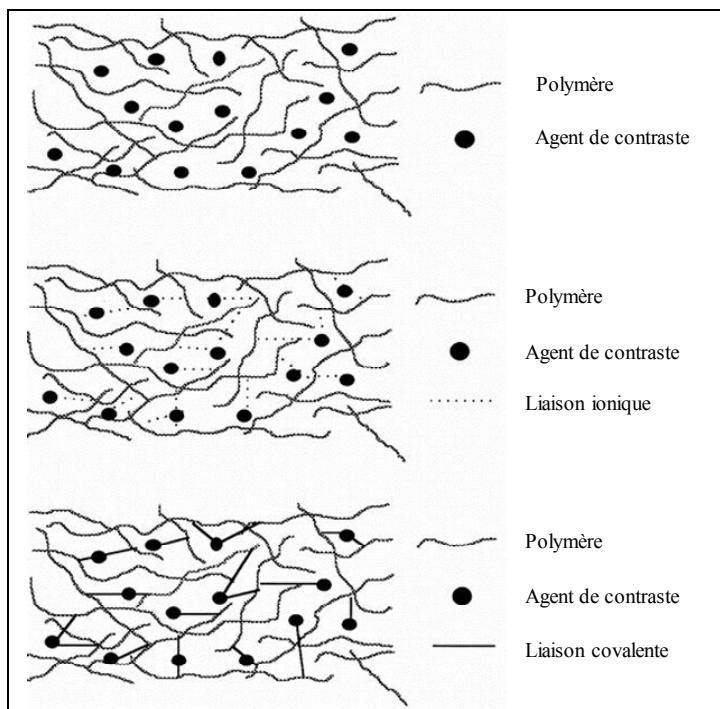


Figure 4.1 Différentes interactions possibles entre un AdC et un polymère

Adaptée de Mottu, Rüfenacht et Doelker (1999)

4.2.1 La taille et la concentration molaire des molécules de l'AdC

Les AdC sont composés de molécules iodées qui permettent la visualisation en radiographie, ainsi que de tampons pH et de stabilisateurs. L'ajout de ces éléments, en particulier les grosses molécules iodées, produit une augmentation de l'accrochage et de la friction entre les chaînes polymériques. Ce phénomène influence de façon marquante les propriétés de la

solution. Tout d'abord, la viscosité d'une solution est directement reliée à la friction et à l'accrochage entre les molécules la constituant (Kuo et Ma, 2001). L'évaluation de la viscosité en fonction de la concentration en Isovue® semble illustrer cette explication. Les résultats ont en effet démontré que la viscosité des solutions est directement proportionnelle à la concentration en Isovue® incorporée dans la solution (*voir* Figure 3.2A). Bien que l'effet de la concentration n'ait pas été testé avec les autres AdC, on peut supposer que la tendance aurait été la même.

La masse moléculaire de l'iodixanol (Visipaque®, 1550 g/mol) étant du double de celle de la iopamidol (Isovue®, 809 g/mol), on aurait pu s'attendre à ce qu'elle produise une solution plus visqueuse pour une même concentration volumique, ce qui n'est pas le cas (2,27 Pa.s contre 2,49 Pa.s). Ceci peut s'expliquer par la plus faible concentration molaire en molécule active dans le Visipaque® (0,42 mol/ml versus 0,97 mol/ml). Cette constatation est aussi applicable pour la solution composée de Conray® qui obtient une viscosité intermédiaire avec sa concentration molaire en sel de méglumine iothalamate de 0,74 mol/ml. En somme, la concentration molaire et la taille des molécules dans l'AdC influencent la viscosité de la solution de chitosane par le biais de la friction et de l'accrochage.

Cette augmentation de viscosité produit aussi un effet sur le temps et la vitesse de gélification. Le concept d'hydrogel thermodépendant implique l'utilisation de la température pour initier la formation d'un réseau tridimensionnel de chitosane par précipitation. C'est la chaleur apportée au système qui produit le transfert de proton du chitosane vers le β GP, réduisant l'ionisation du chitosane et les forces électrostatiques répulsives (Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). La diffusion de chaleur dans un système de chitosane très visqueux est ralentie comparativement à une solution moins visqueuse (Cho *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006a). La diffusion de chaleur étant moins bonne, l'énergie se rend plus difficilement au cœur de la solution ce qui retarde et ralentit la gélification (Cho *et al.*, 2006a).

Les résultats obtenus pour le temps et la vitesse de gélification ne reflètent cependant pas exactement ce constat puisque la formulation composée de Conray®, bien qu'ayant une

viscosité un peu plus faible que celle avec l’Isovue[®] (2,40 versus 2,49 Pa.s respectivement), a montré un t_{gel} plus élevé (31 versus 25 min) et une vitesse de gélification bien inférieure (2,75 versus 4,35 Pa/min). Dans la prochaine section, nous allons voir que d’autres facteurs peuvent également influencer la viscosité et la cinétique de gélification des solutions de chitosane.

4.2.2 La tonicité des AdC

La force ionique de la solution de chitosane dépend de la concentration en ions présents et de leurs charges respectives. L’ajout d’AdC produit une augmentation de la force ionique, plus marquée dans le cas des AdC hypertoniques (Conray[®] surtout, mais aussi Isovue[®]), comparativement au Visipaque[®] (*voir* Figure 3.14B), car ils contiennent plus d’ions ou de molécules ioniques (osmolalité 1400, 796 et 290 mOsm/kg respectivement).

Le chitosane ayant une structure semi-flexible, une modification de la force ionique du milieu influence la conformation de la chaîne polymérique (Brugnerotto *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2006c; Rinaudo, 2008; Rinaudo, 2007). Les ions/molécules chargées négativement présents dans la solution, celles de β GP comprises, forment un écrantage électrostatique (blindage) qui limite la portée de la force électrostatique répulsive produite par les amines protonées du chitosane ($-NH_3^+$), rend la molécule plus compacte et réduit sa viscosité intrinsèque ($[\eta]$) (*voir* Figure 4.2) (Berger *et al.*, 2004b; Brugnerotto *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006c). La tonicité peut aussi influencer le temps et la vitesse de gélification en augmentant la température de précipitation (T_p). Puisque la T_p représente la température à laquelle la solution se gélifie rapidement, lorsqu’elle augmente, le transfert de proton se fait plus lentement et augmente le temps et la vitesse de gélification. Dans notre contexte, si la T_p de la solution de chitosane devient supérieure à 37°C, la gélification peut devenir très longue et très lente.

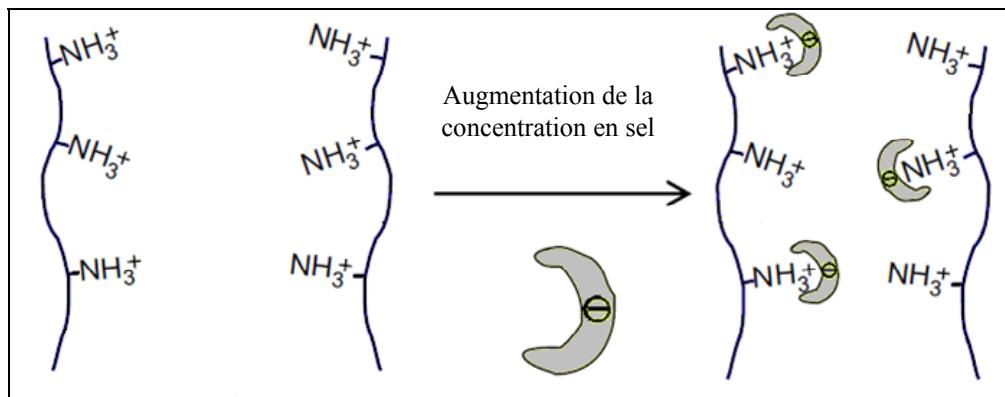


Figure 4.2 Schéma représentant l'écrantage électrostatique (blindage) des groupements amine chargés positivement avec l'ajout de sel dans la solution de chitosane

Adaptée de Chiu *et al.* (2009)

Bien que celle-ci n'a pas été déterminée dans le cadre de cette maîtrise à cause du manque de matériau, il est tout de même possible de déduire que l'incorporation d'AdC augmente la T_p des solutions, car le temps de gélification augmente et la vitesse diminue. L'étude de Lavertu, Filion et Buschmann (2008), ont démontré que le DDA, la concentration en β GP et la concentration en sel (force ionique) de la solution influencent la T_p . Dans l'étude actuelle, seule la force ionique de la solution peut produire une modification de la T_p .

La force ionique de la solution affecte la T_p en réduisant le potentiel de surface des chaînes polymériques qui se retrouvent alors sous forme compacte (Filion, Lavertu et Buschmann, 2007; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Dans cette situation, les forces électrostatiques répulsives produisent par les groupements $-\text{NH}_3^+$ diminuent ayant pour conséquence d'augmenter l' α_p et de rendre le chitosane plus propice à la précipitation. La T_p devrait alors diminuer et la gélification rapide devrait se faire à plus faible température (Filion, Lavertu et Buschmann, 2007; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Toutefois, la réduction du potentiel de surface du chitosane et la baisse du pK_a du β GP (relargage de proton H^+) en présence de sel facilite la protonation du chitosane (augmentation de α) qui contrebalance cette perte de force électrostatique répulsive (Lavertu, 2007). Ce dernier phénomène serait prédominant et produit finalement une augmentation de la T_p en présence de sel (Filion, Lavertu et Buschmann, 2007; Lavertu, Filion et Buschmann, 2008). Dans notre étude, si l'on veut

réduire le t_{gel} et augmenter la vitesse de gélification, il faudrait alors utiliser un AdC avec une faible concentration en sel.

Dans les résultats obtenus, ce phénomène est surtout observable avec la solution de chitosane composée de l'AdC ionique Conray[®], dont le pH est significativement supérieur aux autres solutions (6,3 versus 6,0), signifiant une consommation supérieure des ions H⁺ (augmentation du α). Ceci est particulièrement observable avec le Conray[®] car sa tonicité est deux fois et cinq fois plus importante que celle de l'Isovue[®] et du Visipaque[®]. C'est pour cette raison que, malgré une plus faible viscosité de cette solution comparativement à l'Isovue[®], elle a obtenu un temps de gélification plus long (31 versus 25 min) et une vitesse de gélification plus faible (2,75 contre Pa/min).

4.2.3 Utilisation d'un AdC ionique

Pour mettre le chitosane en solution, l'utilisation d'une solution aqueuse acide permet d'ioniser le chitosane pour former des groupements -NH₃⁺. La création de liaisons entre ces groupements chargés positivement et des groupements chargés négativement d'un autre ion, molécule ionique ou polyélectrolyte peut se produire (*voir* Figure 4.1) (Berger *et al.*, 2004b). Certains hydrogels de chitosane sont d'ailleurs basés sur ce principe (Berger *et al.*, 2004b). Contrairement à la création de liaisons covalentes, la liaison ionique ne nécessite aucun catalyseur, se produit généralement dans un milieu aqueux acide et est réversible (Berger *et al.*, 2004b).

Notre hypothèse de départ était que l'ajout de Conray[®] (ionique) pourrait favoriser ce type de liaison ionique avec le chitosane. L'élément radio-opaque dans le Conray[®] est le sel de méglumine iothalamate qui se sépare en deux molécules chargées. L'une de ces molécules, qui contient justement l'iode, possède un groupement -COO⁻ propice à la création de liaisons ioniques avec les -NH₃⁺ (Rinaudo, 2008). Les complexes polyélectrolytes les plus couramment observés avec le chitosane sont justement produits à l'aide de polysaccharides portant ces groupements anioniques carboxylés (Berger *et al.*, 2004b). Ce principe peut aussi

s'appliquer avec les produits d'additions ionisés (stabilisateur et tampon pH) présents dans les 3 générations d'AdC testées (Berger *et al.*, 2004a). Dans l'étude actuelle, il est plutôt difficile de dire s'il y a création de ce type de liaison, en particulier avec le Conray[®], et si elle perdure après la gélification. La vitesse de relargage de l'agent radio-opaque suggère que non. Malgré tout, la création de liaisons ioniques (voire covalentes) est une avenue intéressante pour optimiser les propriétés mécaniques du produit, comme il sera discuté plus loin.

4.3 Le chitosane sous forme de gel

4.3.1 Résistance mécanique des gels

Les propriétés mécaniques du thermogel de chitosane sont des caractéristiques régissant l'efficacité d'embolisation du sac anévrismal. Le gel doit résister à des sollicitations cycliques, tant en cisaillement qu'en compression, produite par le sang et les mouvements du patient. Une fragmentation ou une trop grande déformation pourrait engendrer une migration du gel dans le système cardiovasculaire ou permettre une perfusion du sac anévrismal par le sang. L'évaluation du module de conservation en cisaillement, du module sécant en compression, de la dureté et de la cohésion a permis d'estimer la résistance mécanique des gels. Toutefois, le choix des paramètres de tests est arbitraire et d'autres essais (modèles *in vitro* et *in vivo*) seraient nécessaires pour conclure quant à la capacité de bloquer les fuites sanguines ou de résister aux sollicitations que les gels pourraient subir *in vivo*. Nos résultats permettent cependant une comparaison avec certains produits déjà existant.

Il n'y a pas beaucoup d'information au sujet de la résistance mécanique des agents embolisant utilisés au niveau intracrânien comme les acrylates et l'Onyx[®]. Malgré tout, les informations recueillies sur l'alginate de calcium réfèrent à un produit spécialement développé pour l'embolisation des AAA et il est possible de faire une comparaison de notre produit avec celui-ci. Par surcroît, selon Becker *et al.* (2005), l'Onyx[®] et le TruFill[®]

(polyacrylate) auraient une résistance mécanique similaire à celle de l’alginat de calcium (Becker *et al.*, 2005).

Le gel de chitosane au centre de notre recherche possède des propriétés mécaniques nettement inférieures à l’alginat, autant en cisaillement qu’en compression (*voir Tableau 4.1*). En cisaillement, le module G’ maximal observée est de 1,8 kPa avec l’AdC Visipaque® comparativement à entre 10 et 40 kPa pour l’alginat de calcium. Les AdC n’ont pas beaucoup d’influence sur la résistance en cisaillement, peu importe la concentration, le type d’AdC ou le DDA du chitosane utilisé, au niveau clinique (*voir Figure 3.5*). On peut tirer le même constat des tests en compression. Les propriétés sont faibles comparativement à l’alginat (*voir Tableau 4.1*) et il n’y a pas beaucoup de différence entre les résultats obtenus pour les modules sécants, la dureté et l’énergie de cohésion selon le type d’AdC incorporé.

Cette faible résistance mécanique pose un souci quant à l’efficacité de l’embolisation et à la sécurité du patient suite à l’injection de ce produit. Toutefois, le développement de l’hydrogel de chitosane pour l’embolisation des AAA étant à ses débuts, des améliorations peuvent être apportées. En modifiant le DDA, la Mw et en greffant ou ajoutant d’autres polymères spécifiques sur le chitosane, il serait possible d’augmenter significativement les propriétés mécaniques du gel (Kuo et Ma, 2001; Wang et Stegemann, 2010b). Des essais préliminaires en rhéométrie, effectués par notre équipe de recherche sur un gel de chitosane où de la chondroïtine-4-sulfate avait été greffée de façon covalente sur le chitosane avant la gélification, ont démontré qu’il était possible de quadrupler le module G’ sans altérer la thermodépendance du gel (Berrahmoune *et al.*, 2011), présentation à la Société Canadienne des Biomatériaux, Vancouver, Canada). Les prochaines recherches sur l’hydrogel de chitosane comme agent embolisant devraient se pencher sur cet aspect important.

4.3.2 La radio-opacité et la vitesse de relargage

Les essais par tomodensitométrie ont démontré que tous les gels produits avec 20 % v/v d’AdC étaient suffisamment radio-opaques pour un bon suivi de la solution/gel en clinique.

Les résultats démontrent que la densité Hounsfield des gels est directement proportionnelle à la quantité d’iode présent dans le gel (*voir* Tableau 3.2). Malgré que les différences cliniques risquent d’être minimes, l’utilisation d’un AdC avec une forte concentration en iodé pourrait faciliter le suivi radiologique. De ce point de vue, l’Isovue® serait probablement plus approprié pour élaborer un agent embolisant à base de chitosane.

Les produits embolisant existants utilisent normalement du lipiodol ou de la poudre de tantale pour rendre le produit radio-opaque. Ces derniers ne sont généralement pas relargués rapidement et produisent des artéfacts lors des suivis radiologiques compliquant le dépistage d’endofuites (Grisafi *et al.*, 2010; Loh et Duckwiler, 2010; Martin *et al.*, 2001). L’étude sur la vitesse de relargage des AdC a permis de vérifier que ces derniers ne restaient pas emprisonnés dans le gel. La majorité des AdC sont diffusés dans la solution saline après 4h. Même si le Conray® se libère un peu plus rapidement que l’Isovue® et le Visipaque®, le temps nécessaire pour relarguer tous les AdC est très court et suggère qu’il n’y aurait pas différence clinique entre les trois AdC. Bien que l’on ne puisse pas extrapoler ces résultats à des conditions *in vivo*, ce relargage rapide devrait faciliter le suivi radiologique et la détection d’endofuites suite à l’embolisation. Le thermogel de chitosane possède cet avantage sur les produits embolisant existants.

4.4 Effet de l’AdC sur le comportement du gel

Bien que l’effet des AdC sur les propriétés mécaniques des gels soit limité, on note tout de même une certaine amélioration de la résistance mécanique des gels qui augmentent sensiblement avec la concentration d’AdC. Les principaux phénomènes responsables de cette amélioration sont la concentration en molécules/ions et la tonicité des AdC. Alors que la quantité de molécules présentes dans l’AdC affecte l’occlusion stérique et la friction entre la phase liquide et la structure solide du gel, la tonicité affecte la densité de réticulation et d’enchevêtrement des chaînes polymérique (la porosité du gel), le gradient de diffusion et la pression osmotique à l’intérieur du gel. Ces paramètres ont aussi un effet sur la vitesse de relargage des AdC.

4.4.1 La taille et la concentration molaire des molécules de l'AdC

Il a été discuté du rôle de la taille et de la concentration molaire en molécule de l'AdC sur la friction et l'accrochage. Dans le cas des gels, c'est plutôt la friction et l'occlusion stérique dont il est question. L'occlusion stérique se traduit par la fermeture des pores du réseau tridimensionnel de chitosane par les molécules. Au niveau mécanique, l'occlusion stérique, tout comme la friction, limite la circulation de la phase liquide du gel et produit une augmentation de la résistance mécanique. Une forte concentration molaire de molécules de grande taille aura tendance à produire une augmentation plus significative des propriétés mécaniques.

Les résultats obtenus en compression (modules sécants, dureté et énergie en cohésion) semblent vérifier cette hypothèse : il y a en effet une augmentation des propriétés mécaniques lorsqu'on augmente la concentration en AdC utilisé (*voir* Figure 3.6, Figure 3.7, Figure 3.8). Toutefois, en se concentrant sur les résultats obtenus en rhéologie, on n'observe aucun changement notable du module en cisaillement avec l'ajout d'AdC (*voir* Figure 3.5). Nous verrons plus tard l'importance de la tonicité des AdC sur la résistance mécanique des gels, ce qui permettra de comprendre ce comportement en rhéométrie.

Une grande différence de tendance entre les résultats en rhéométrie et en compression a été observée. Cette différence découle principalement du fait que les échantillons en rhéométrie n'étaient pas immergés contrairement aux essais en compression. L'immersion des échantillons apporte une nouvelle dimension à la résistance mécanique des gels en incorporant les notions de diffusion et de pression osmotique.

Le gradient de diffusion représente la tendance des molécules ou ions à circuler de l'endroit le plus concentré vers le moins concentré afin d'atteindre un état d'équilibre. La diffusion des molécules, chargées ou non, composants l'AdC du gel vers le milieu salin aurait tendance à réduire la résistance en compression du gel (Coviello *et al.*, 2005).

La vitesse de relargage de l'AdC constitue une bonne façon de visualiser ce phénomène. Il a été démontré par le test tomodensitométrique que les gels composés de Conray® ou d'Isovue® libèrent plus rapidement leurs molécules actives que le Visipaque® après 4 h d'immersion (80, 68 et 56 % v/v du volume initial). De plus, on s'aperçoit que le gel composé de Conray® obtient une vitesse de relargage supérieur à l'Isovue® : la tonicité accentue l'effet de diffusion (Coviello *et al.*, 2005). La dimension des molécules a un impact aussi sur la diffusion, car les grosses molécules, comme celles composant le Visipaque®, ont tendance à rester emprisonnées par occlusion stérique dans la structure du gel. D'ailleurs, les résultats obtenus en microscopie à balayage tendent à montrer cet effet alors qu'à une concentration de 30 % en AdC, tous les pores du gel de chitosane sont bouchés (*voir* Figure 3.12).

Au niveau des propriétés mécaniques, ces deux phénomènes sont surtout observables avec la perte d'énergie en cohésion lors de la 2^e compression. Alors que le gel sans AdC et avec Visipaque® (iso osmolaire) obtiennent une perte en cohésion d'environ 38 %, elle atteint environ 42 % avec les solutions hypertoniques. Durant la première compression, le relargage des molécules est facilité par le phénomène de diffusion. Lors de la 2^e compression, une partie des molécules responsables de la cohésion du gel ne sont plus présentes et le gel nécessite alors moins d'énergie pour se déformer.

Le choix d'un AdC en fonction de ces phénomènes (occlusion stérique et diffusion) reste difficile, car ils ont des effets contraires. Par exemple, il serait intéressant de réduire au maximum la diffusion de l'AdC du gel pour obtenir de bonnes propriétés mécaniques, mais d'un autre côté, il faut que l'AdC soit relargué pour permettre de faire le suivi radiologique avec AdC. Cependant, vu la faible différence des propriétés mécaniques entre les formulations incorporant des AdC qu'il pourrait y avoir au niveau clinique, le Visipaque® semble un compromis idéal.

4.4.2 La tonicité des AdC

La densité de réticulation et d'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires de chitosane est un élément directement relié à la résistance mécanique du gel et du relargage de l'AdC (Berger *et al.*, 2004a). Elle peut être observée par la porosité des gels. Une densité de réticulation élevée donne lieu à une faible porosité, synonyme de résistance accrue et de taux de relargage faible, limité par la mobilité réduite de la phase liquide à l'intérieur du gel (Berger *et al.*, 2004b; Kuo et Ma, 2001; Lee *et al.*, 2009a; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

Dans l'étude actuelle, la densité de réticulation et d'enchevêtrement a été modifiée par la modification de la conformation des chaînes alors que le chitosane se trouvait en solution. Comme il a été dit précédemment, il y a une réduction de la $[\eta]$ lorsque la force ionique du système augmente. Dans cette situation, les concentrations de chevauchement (C^*) (concentration à laquelle les chaînes commencent à se chevaucher) et d'attachement (C_e) (concentration à laquelle les chaînes commencent à s'accrocher les unes aux autres) augmentent et se manifestent par une baisse de l'interaction entre les chaînes de chitosane (Cho *et al.*, 2005). La baisse d'interaction entre les chaînes lors de la gélification d'une solution où la force ionique est élevée diminue la densité de réticulation et augmente la porosité du gel.

Les résultats obtenus en MEB penchent en ce sens. En observant les images, on constate qu'avec l'ajout d'AdC, la porosité du gel devient hétérogène avec des pores plus volumineux selon la concentration et la tonicité de l'AdC. Il faut cependant préciser que pour des concentrations supérieures à 10 % v/v en AdC, les images en MEB ne nous semblent pas très représentatives de la structure du gel. Tout d'abord, les images obtenues sont une visualisation 2D de la structure polymérique ; il n'y a pas d'information quant à la porosité interne du gel et de l'interconnectivité des pores. Ensuite, avec la technique employée l'AdC et le β GP sont emprisonnés dans le gel lors de la lyophilisation. Ces deux constituants bouchent alors les pores et appliquent un surcroît de pression sur le réseau polymérique qui se déforme lors de la centrifugation. La déformation du réseau polymérique est

particulièrement observable en comparant les coupes transverse et sagittale de l'échantillon composé de Conray® (*voir* Figure 3.13). L'utilisation d'un micro-CT, constituerait une bonne technique pour déterminer la porosité et l'interconnectivité en 3D du gel de chitosane sans avoir à rincer le gel (Knackstedt *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). De plus, après avoir rincé le gel pour éliminer l'AdC, il ne serait pas nécessaire de déshydrater le gel pour faire la reconstruction 3D, ce qui réduirait l'imprécision causée par la lyophilisation. Cela permettrait de mieux comprendre les effets des AdC sur la structure polymérique du gel de chitosane et de l'impact que cela a sur les propriétés mécaniques. Il serait aussi intéressant de voir la morphologie du gel après différents temps d'immersion.

La diminution de la densité de réticulation explique aussi le comportement des gels en rhéométrie. Malgré une augmentation de l'occlusion stérique et de la friction selon la concentration, l'augmentation de la porosité élimine ce gain de résistance en cisaillement. Une augmentation de la porosité facilite aussi le relargage de l'AdC et pourrait être la raison pourquoi le Conray® se libère plus aisément du gel que l'Isovue® (Jarry *et al.*, 2001; Ruel-Gariépy *et al.*, 2000). Dans une situation de forte porosité, il y a une réduction de la force nécessaire pour lutter contre l'occlusion stérique et la friction produite entre les molécules en suspension avec le réseau polymérique du gel.

La tonicité des milieux affecte aussi la résistance mécanique des gels par l'entremise de la pression osmotique. Ce phénomène nécessite que l'échantillon soit immergé et est particulièrement observable dans les essais en compression. La tonicité variable des AdC affecte différemment la tonicité de la phase liquide à l'intérieur du gel et leurs propriétés mécaniques.

Dans les hydrogels, il y a un équilibre entre la pression osmotique, la répulsion électrostatique responsable du gonflement et la force de contraction du réseau polymérique, ce dernier luttant contre les deux premières (Berger *et al.*, 2004b). La pression osmotique a pour effet de faire circuler à travers une membrane semi-perméable le solvant de la phase liquide d'une concentration faible en osmole vers la concentration forte en osmole jusqu'à

l'obtention d'un état d'équilibre. Dans le cas des hydrogels de chitosane, certaines molécules de la phase liquide sont emprisonnées dans le réseau polymérique et peuvent produire ce phénomène d'osmose. Une forte pression osmotique favorise la rétention d'eau à l'intérieur du réseau polymérique et augmente la résistance à la compression. Dans un tel contexte, l'utilisation d'AdC hypertonique permet d'augmenter la résistance à la compression.

4.5 L'effet toxique des extraits

Étant donné l'utilisation *in vivo* de ces gels, leur biocompatibilité est importante. Dans le cadre de ce projet, nous avons évalué la cytotoxicité des extraits, c'est-à-dire la mortalité cellulaire induite par les produits relargués par les gels. Les résultats montrent que le CH sans AdC est légèrement毒ique (6% de mortalité). Ceci est en accord avec les travaux d'autres équipes qui ont montré une corrélation de la toxicité avec la concentration en β GP du gel (ici 12%) (Ahmadi et Bruijn, 2008). Ceci serait dû à l'augmentation de l'osmolalité de la solution suite au relargage rapide du β GP (Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

L'ajout d'AdC augmente significativement la toxicité des extraits. Ceci serait dû au moins en partie à une augmentation de l'osmolalité lors du relargage des AdC. En effet, les gels composés d'Isovüe[®] et de Conray[®], étant hypertoniques, ont obtenu les plus fortes osmolalités (586 et 609 mOsm/kg respectivement), mais aussi les mortalités cellulaires les plus élevées (38 et 33 % respectivement). Par contre le Visipaque[®] (iso osmolaire) augmente peu l'osmolalité (557 versus 497 mOsm/kg), mais significativement la mortalité cellulaire (23 versus 6%) par rapport au CH, ce qui suggère qu'il y a aussi un effet cytotoxique direct sur les cellules, au moins dans le cas du Visipaque[®]. Ceci a d'ailleurs été observé lors des essais de cytotoxicité effectués sur les AdC en solution à 2, 7 et 20% v/v, qui ont montré un effet cytotoxique de chacun des AdC sur les L929 (résultats de Saoussen Berrahmoune, non montrés).

Quoiqu'il en soit, les extraits obtenus lors du deuxième 24 h d'exposition ont une osmolalité beaucoup plus proche de la normale (400 mOsm/kg) et ne sont pas du tout toxiques. De plus,

il est connu que les essais de cytotoxicité *in vitro* exagèrent la réaction biologique *in vivo*. Dans la réalité clinique, on peut penser que les produits de relargage seront éliminés par l'organisme au fur et à mesure qu'ils seront relargués, les cellules étant exposées à une plus faible concentration d'AdC/βGP que les essais *in vitro* effectués. L'incorporation d'AdC dans la solution de chitosane ne devrait pas induire une toxicité prolongée et constitue une bonne façon de rendre le thermogel radio-opaque pour assurer le suivi lors de l'embolisation.

4.6 Limite de la recherche

Le principal problème rencontré durant cette recherche consiste à la faible quantité de chitosane disponible. En cours d'étude, la compagnie fournissant le chitosane a cessé sa production due à des réorientations d'exploitations. Le chitosane étant un produit fortement influencé par ses caractéristiques (DDA, Mw, polydispersité des chaines et la pureté) et étant très difficile d'en retrouver un identique chez un autre fournisseur, on a dû restreindre l'élaboration de protocoles expérimentaux et l'expérimentation elle-même.

Au niveau de l'évaluation des propriétés mécaniques, il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus et ceux publiés pour les produits embolisants déjà existants. Tout d'abord, il y a peu d'information et les techniques employées ne sont pas toujours décrites avec précision, d'autant plus que la caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels n'est pas normalisée dans la littérature scientifique. Étant des produits viscoélastiques, voire biphasiques, il y a beaucoup de paramètres à prendre en compte et chacune des équipes de recherche détermine ses propres paramètres selon ses besoins. Pour cette raison, il est difficile d'affirmer avec certitude que les comparaisons effectuées durant cette étude sont réellement applicables et d'estimer leur pertinence du point de vue clinique. Des essais plus poussés pourraient être effectués afin de caractériser par exemple l'influence de la vitesse de chargement, les phénomènes de relaxation, la modification des propriétés lors du relargage des AdC, etc. L'utilisation de techniques d'indentation pourrait notamment être intéressante. Dans le cadre de cette recherche, les paramètres utilisés ont été choisis pour faire une comparaison avec d'autres études, mais des

paramètres se rapprochant davantage de la pratique auraient permis d'avoir une meilleure idée du comportement du gel dans un contexte d'embolisation des AAA. Il serait aussi intéressant de développer un modèle mathématique théorique permettant d'analyser les résultats en compression pour définir les propriétés intrinsèques du gel, comme Sergerie *et al.* (2009) et Soulhat *et al.* (1999) l'ont fait pour leur application respective. De façon plus générale, l'élaboration de normes permettrait de standardiser la caractérisation mécanique des gels. Quoiqu'il en soit cette étude, faite au meilleur de nos connaissances, nous a donné un premier aperçu des propriétés de ces gels et nous a permis de mettre en lumière cette limitation importante.

Ensuite, la portée de cette recherche consistait à identifier les différents comportements adoptés par le chitosane selon ses caractéristiques (DDA, Mw...). En général, l'ajout AdC augmente la viscosité de la solution, réduit la vitesse de gélification, améliore légèrement les propriétés mécaniques et permet d'obtenir une bonne visualisation en imagerie. Toutefois, de façon plus spécifique, le type d'AdC semble produire des effets contraires lorsque l'on compare les résultats obtenus avec les chitosane à DDA de 82,8 % et 94,4 % pour la vitesse de gélification et le module G' après une semaine de gélification (*voir* Figure 3.4B et D et Figure 3.5). Il est alors difficile de dire que les tendances relevées dans l'étude actuelle s'appliquent à tous les types de chitosane d'où l'importance de bien comprendre les interactions possibles entre les AdC et le chitosane. Il est aussi important de noter que, bien que le gel de chitosane soit destiné à être injecté dans l'anévrisme, les comportements de la solution et du gel de chitosane n'ont pas été évalués en présence de sang.

4.7 Choix d'un AdC pour l'élaboration de l'agent embolisant

En analysant les résultats, on a pu constater que l'utilisation d'un AdC dans la solution de chitosane modifie son comportement autant sous forme de solution que de gel. Au final, si l'on compare les résultats obtenus avec les différents AdC, il n'y a pas de différence significative au niveau clinique. Optimiser la solution en choisissant un AdC adéquat demeure tout de même important.

Les AdC sont rapidement relargués et les améliorations mécaniques qu'ils apportent au gel par l'augmentation de l'occlusion stérique devraient être temporaires et ne peuvent donc pas être considérées comme un avantage. De plus, les AdC hypertoniques (Isovue® et Conray®) devraient réduire la conformation du chitosane, la densité de réticulation et augmenter la porosité du gel. Dans l'étude actuelle, la technique employée (MEB) ne permettait pas d'observer ces phénomènes, mais selon la littérature ils sont bien présents. Au niveau de la migration des cellules pour la guérison de l'anévrisme et la dégradation du gel ceci constituerait un avantage, mais pas en se qui concerne les propriétés mécaniques une fois les AdC relargués. Du point de vue de la biocompatibilité, l'utilisation d'un AdC de 3^e génération isotonique avec une faible concentration molaire en molécule semble la meilleure option. Les améliorations apportées aux AdC visaient à réduire les interactions avec les tissus biologiques (Krause et Niehues, 1996). Les conclusions de cette étude tendent à croire qu'il faudrait appliquer ce concept au thermogel de chitosane et utiliser un AdC de 3^e génération.

4.8 Recherches futures

La prochaine priorité suite à ce travail sera d'évaluer davantage le thermogel de chitosane de DDA élevé (94,4%) puisque les résultats préliminaires suggèrent que ce matériau est bien adapté à l'application clinique visée. De plus, il serait intéressant d'évaluer les propriétés mécaniques du gel et la porosité du gel par MEB après rinçage pour déterminer le véritable effet des AdC sur la conformation et la structure du gel à long terme, une fois l'AdC et le βGP relargués. L'utilisation d'un micro-CT pour faire un lien entre la porosité des gels et leurs propriétés mécaniques assurerait une meilleure compréhension du comportement du thermogel de chitosane radio-opaque (Malafaya *et al.*, 2008). Il serait aussi utile d'évaluer la propriété mucoadhésive du gel puisqu'une bonne adhésion entre la paroi de l'artère et le gel pourrait limiter l'apparition d'endofuite. L'agent embolisant devant résider dans l'anévrisme un certain temps, évaluer la résistance en fatigue pourrait être une bonne façon de vérifier le comportement *in vivo* à long terme du chitosane.

Les résultats de cette recherche suggèrent que les propriétés mécaniques du thermogel pourraient être insuffisantes, mais ceci devrait être vérifié par des essais plus appropriés. Concevoir un banc d'essai simulant l'embolisation d'un AAA, tel que dans les articles de Barnett *et al.* (2009) et Barnett et Gailloud (2011), permettrait de vérifier l'adéquation des propriétés de la solution de chitosane avec les besoins déterminés (Barnett et Gailloud, 2011; Barnett *et al.*, 2009). Par la suite, plusieurs améliorations pourront être apportées à la formulation par le greffage et l'utilisation de différentes molécules selon l'évolution du projet.

CONCLUSION

La récurrence des endofuites après une EVAR constitue l'une des principales complications limitant le succès de la réparation. Une piste de solution pour réduire ce type de complication consiste à utiliser un agent embolisant pour occire le sac anévrismal de la circulation sanguine. Dans l'étude actuelle, nous avons évalué les impacts produits par trois différents AdC sur le comportement d'un thermogel de chitosane et la possibilité de l'utiliser comme agent embolisant.

Le développement d'un agent embolisant radio-opaque à base de chitosane pourrait être une façon prometteuse de résoudre les problèmes reliés aux endofuites après une EVAR. Le principe thermogélifiant est un avantage considérable puisqu'il élimine l'utilisation de catalyseur ou la nécessité de faire un mélange de solutions afin d'induire la polymérisation/géification qui peuvent s'avérer non homogènes. Dans cette étude, nous avons confirmé qu'il est possible d'incorporer 20 % v/v en AdC dans la solution de chitosane sans trop nuire à la géification et en obtenant une bonne visualisation par rayon X. Le chitosane de DDA 94,4 % possède ainsi un temps et une vitesse de géification proche de l'idéal permettant de l'injecter par cathéter de façon distale et sécuritaire. L'AdC serait vite relargué et faciliterait le suivi post embolisation. La principale limitation actuellement avec ce produit est la faible résistance mécanique du gel obtenu. Toutefois, il est possible d'apporter des modifications à la formulation qui permettraient de l'améliorer considérablement. De plus, puisque le DDA influence également la vitesse de biodégradation, d'autres essais seraient requis pour optimiser le temps de résidence du chitosane.

Il ressort de l'étude que les AdC modifient légèrement le comportement de l'hydrogel de chitosane par le biais de trois caractéristiques, soit la concentration en molécules présentes dans le produit, autant que la taille de ces molécules, et la tonicité. Ces caractéristiques affectent tous les aspects du thermogel étudié, tels la viscosité et le processus de géification de la solution, ainsi que la résistance mécanique, la radio-opacité, la biocompatibilité et la

structure du gel obtenu. Nous avons aussi constaté que ces modifications peuvent varier en fonction du DDA du chitosane utilisé.

Les différences obtenues entre les AdC sont relativement faibles et probablement peu significatives au plan clinique. Nous pensons cependant que l'utilisation des AdC de 3^e génération devrait être favorisée dans l'élaboration de cet agent embolisant à base de chitosane. Cette recommandation prend racine dans le fait que les AdC de 3^e génération sont moins susceptibles de produire des interactions avec le chitosane (modification de la T_p et de la conformation des chaînes polymériques, création de liaison ionique...). De plus, ces agents sont plus stables et seront davantage utilisés en clinique à l'avenir puisqu'ils ont été développés pour réduire les effets néfastes induits par les autres générations. Ils devraient alors être facilement accessibles et moins coûteux.

Il sera intéressant de voir de quelle façon le thermogel de chitosane pourra évoluer pour finalement être utilisé comme agent embolisant. Améliorer les protocoles d'expérimentation afin de les standardiser permettrait de faire une meilleure analyse des différents paramètres influençant les comportements du gel et d'accélérer le développement du produit. À plus long terme, le greffage ou l'ajout de molécules spécifiques pour favoriser la guérison et la formation d'un tissu fibreux dans le sac anévrismal et accentuer les propriétés mécaniques pourraient augmenter l'efficacité du thermogel embolisant de chitosane et ainsi les chances de succès de l'EVAR.

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abada, Hicham T., et Jafar Golzarian. 2007. « Gelatine Sponge Particles: Handling Characteristics for Endovascular Use ». *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, vol. 10, n° 4, p. 257-260.
- Ahmadi, Raheleh, et Joost D. de Brujin. 2008. « Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 86A, n° 3, p. 824-832.
- Allison, Matthew A., Kevin Kwan, Dominic DiTomasso, C. Michael Wright et Michael H. Criqui. 2008. « The epidemiology of abdominal aortic diameter ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 48, n° 1, p. 121-127.
- Almdal, K., J. Dyre, S. Hvidt et O. Kramer. 1993. « Towards a phenomenological definition of the term 'gel' ». *Polymer Gels and Networks*, vol. 1, n° 1, p. 5-17.
- Andrews, Gavin P., Sean P. Gorman et David S. Jones. 2005. « Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices ». *Biomaterials*, vol. 26, n° 5, p. 571-580.
- Armstrong, C. G., W. M. Lai et V. C. Mow. 1984. « An analysis of the unconfined compression of articular cartilage ». *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 106, p. 165-173.
- Association canadienne de normalisation, et Organisation internationale de normalisation. 2001. *Évaluation biologique des dispositifs médicaux : Partie 5 : essai concernant la cytotoxicité in vitro*, 2e éd.. Norme internationale, ISO 10993-5. Toronto (Ont.): CSA International, 9 p.
- Ayad, Michael, Eric Eskioglu et Robert A Mericle. 2006. « Onyx®: a unique neuroembolic agent ». *Expert Review of Medical Devices*, vol. 3, n° 6, p. 705-715.
- Barnett, Brad P., et Philippe Gailloud. 2011. « Assessment of EmboGel--A selectively dissolvable radiopaque hydrogel for embolic applications ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 22, n° 2, p. 203-211.
- Barnett, Brad P., Andrew H. Hughes, Sopo Lin, Aravind Arepally et Philippe H. Gailloud. 2009. « In vitro assessment of EmboGel and UltraGel radiopaque hydrogels for the endovascular treatment of aneurysms ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 20, n° 4, p. 507-512.

- Baum, Richard A., S. William Stavropoulos, Ronald M. Fairman et Jeffrey P. Carpenter. 2003. « Endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 14, n° 9, Part 1, p. 1111-1117.
- Becker, T. A., D. R. Kipke et K. Brakora. 2003. « Endovascular embolization of aneurysms with ALGEL® : an in vitro study of delivery techniques and resulting gel stability ». In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2003. Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE* (17-21 Sept. 2003). Vol. 1, p. 289-292 Vol.1.
- Becker, Timothy A., Daryl R. Kipke et Tedd Brandon. 2001. « Calcium alginate gel: A biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization ». *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 54, n° 1, p. 76-86.
- Becker, Timothy A., Daryl R. Kipke, Mark C. Preul, William D. Bichard et Cameron G. McDougall. 2002. « In vivo assessment of calcium alginate gel for endovascular embolization of a cerebral arteriovenous malformation model using the swine rete mirabile ». *Neurosurgery*, vol. 51, n° 2, p. 453-459.
- Becker, Timothy A., Mark C. Preul, William D. Bichard, Daryl R. Kipke et Cameron G. McDougall. 2005. « Calcium alginate gel as a biocompatible material for endovascular arteriovenous malformation embolization: Six-month results in an animal model ». *Neurosurgery*, vol. 56, n° 4, p. 793-801.
- Becker, Timothy A., Mark C. Preul, William D. Bichard, Daryl R. Kipke et Cameron G. McDougall. 2007. « Preliminary investigation of calcium alginate gel as a biocompatible material for endovascular aneurysm embolization in vivo ». *Neurosurgery*, vol. 60, n° 6, p. 1119-1128.
- Berger, J., M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt et R. Gurny. 2004a. « Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, n° 1, p. 35-52.
- Berger, J., M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas et R. Gurny. 2004b. « Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, n° 1, p. 19-34.
- Brugnerotto, J., J. Desbrières, L. Heux, K. Mazeau et M. Rinaudo. 2001. « Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution ». *Macromolecular Symposia*, vol. 168, n° 1, p. 1-20.

- Buckenham, Timothy, Michael McKewen, Andrew Laing, Justin Roake, David Lewis et Malcolm K. Gordon. 2009. « Cyanoacrylate embolization of endoleaks after abdominal aortic aneurysm repair ». *ANZ Journal of Surgery*, vol. 79, n° 11, p. 841-843.
- Bush, Ruth L., Peter H. Lin, Russell S. Ronson, Brian S. Conklin, Louis G. Martin et Alan B. Lumsden. 2001. « Colonic necrosis subsequent to catheter-directed thrombin embolization of the inferior mesenteric artery via the superior mesenteric artery: A complication in the management of a type II endoleak ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 34, n° 6, p. 1119-1122.
- Caron, André. 2002. « Les pseudo-allergies médicamenteuses: vraies ou fausses allergies? ». *Le clinicien*, vol. 17, n° 10, p. 87-96.
- Chao, Christine P., Ricardo Paz Fumagalli, Eric M. Walser, J. Mark McKinney, Andrew H. Stockland, Jürgen Falkensammer, Albert G. Hakaim et W. Andrew Oldenburg. 2006. « Percutaneous protective coil occlusion of the proximal inferior mesenteric artery before N-butyl cyanoacrylate embolization of type II endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 17, n° 11, Part 1, p. 1827-1833.
- Chenite, A., M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput et N. Kandani. 2001. « Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions ». *Carbohydrate Polymers*, vol. 46, n° 1, p. 39-47.
- Chenite, A., C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette et A. Selmani. 2000. « Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ ». *Biomaterials*, vol. 21, n° 21, p. 2155-2161.
- Chiu, Ya-Ling, Sung-Ching Chen, Chun-Jen Su, Chun-Wen Hsiao, Yu-Ming Chen, Hsin-Lung Chen et Hsing-Wen Sung. 2009. « pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: In vitro characteristics and in vivo biocompatibility ». *Biomaterials*, vol. 30, n° 28, p. 4877-4888.
- Cho, Jaepyoung, et Marie-Claude Heuzey. 2008. « Dynamic scaling for gelation of a thermosensitive chitosan- β -glycerophosphate hydrogel ». *Colloid & Polymer Science*, vol. 286, n° 4, p. 427-434.
- Cho, Jaepyoung, Marie-Claude Heuzey, Andre Begin et Pierre J. Carreau. 2005. « Physical gelation of chitosan in the presence of β -glycerophosphate; The effect of temperature ». *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 6, p. 3267-3275.

- Cho, Jaepyoung, Marie-Claude Heuzey, André Bégin et Pierre J. Carreau. 2006a. « Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry ». *Food Hydrocolloids*, vol. 20, n° 6, p. 936-945.
- Cho, Jaepyoung, Marie-Claude Heuzey, André Bégin et Pierre J. Carreau. 2006b. « Effect of urea on solution behavior and heat-induced gelation of chitosan- β -glycerophosphate ». *Carbohydrate Polymers*, vol. 63, n° 4, p. 507-518.
- Cho, Jaepyoung, Marie-Claude Heuzey, André Bégin et Pierre J. Carreau. 2006c. « Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength ». *Journal of Food Engineering*, vol. 74, n° 4, p. 500-515.
- Choi, Sun Young, Do Yun Lee, Kwang-Hun Lee, Young-Guk Ko, Donghoon Choi, Won-Heum Shim et Jong Yun Won. 2011. « Treatment of type I endoleaks after endovascular aneurysm repair of infrarenal abdominal aortic aneurysm: Usefulness of N-butyl cyanoacrylate embolization in cases of failed secondary endovascular intervention ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 22, n° 2, p. 155-162.
- Chung, Cindy, Michael Beecham, Robert L. Mauck et Jason A. Burdick. 2009. « The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells ». *Biomaterials*, vol. 30, n° 26, p. 4287-4296.
- Coma, Véronique. 2009. « Système gélifiant de chitosane ». In *Chitine et chitosane: Du biopolymère à l'application*, sous la dir. de Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot, Éric Guibal. p. 145-167. Besançon Cedex: Presse Universitaire de Franch-Compté.
- Conrad, Mark F., Andrew B. Adams, Julie M. Guest, Vikram Paruchuri, David C. Brewster, Glenn M. LaMuraglia et Richard P. Cambria. 2009. « Secondary intervention after endovascular abdominal aortic aneurysm repair ». *Annals of Surgery*, vol. 250, n° 3, p. 383-389.
- Coviello, Tommasina, Franco Alhaique, Chiara Parisi, Pietro Matricardi, Gianfranco Bocchinfuso et Mario Grassi. 2005. « A new polysaccharide gel matrix for drug delivery: preparation and mechanical properties ». *Journal of Controlled Release*, vol. 102, n° 3, p. 643-656.
- Cox, W. P., et E. H. Merz. 1958. « Correlation of dynamic and steady flow viscosities ». *Journal of Polymer Science*, vol. 28, n° 118, p. 619-622.
- Creech, O Jr. 1966. « Endo-aneurysmorrhaphy and treatment of aortic aneurysm ». *Annals of Surgery*. Vol. 164, n° 6, p. 935-946.

- Desbrieres, J. 2002. « Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions ». *Biomacromolecules*, vol. 3, n° 2, p. 342-349.
- Dolmatch, Bart L., et U. Blum. 2000. *Stent-grafts: current clinical practice*. New-York, États-Unis: Thieme Medical Publishers inc., 182 p.
- Drury, D., J. A. Michaels, L. Jones et L. Ayiku. 2005. « Systematic review of recent evidence for the safety and efficacy of elective endovascular repair in the management of infrarenal abdominal aortic aneurysm ». *British Journal of Surgery*, vol. 92, n° 8, p. 937-946.
- Eliason, Jonathan L., et Gilbert R. Upchurch, Jr. 2008. « Endovascular abdominal aortic aneurysm repair ». *Circulation*, vol. 117, n° 13, p. 1738-1744.
- Faries, Peter L., Hadley Cadot, Gautam Agarwal, K. Craig Kent, Larry H. Hollier et Michael L. Marin. 2003. « Management of endoleak after endovascular aneurysm repair: cuffs, coils, and conversion ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 37, n° 6, p. 1155-1161.
- Filion, Dominic. 2006. « Mécanisme de gélification par augmentation de la température du mélange chitosane/glycérol-phosphate ». Montréal, Université de Montréal, 248 p.
- Filion, Dominic, Marc Lavertu et Michael D. Buschmann. 2007. « Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate Systems ». *Biomacromolecules*, vol. 8, n° 10, p. 3224-3234.
- Frank, A. Lederle, R. Johnson Gary, E. Wilson Samuel, L. Gordon Ian, P. Chute Edmund, N. Littooy Fred, C. Krupski William, Bandyk Dennis, W. Barone Gary, M. Graham Linda, J. Hye Robert et B. Reinke Donovan. 1997. « Relationship of age, gender, race, and body size to infrarenal aortic diameter ». *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, vol. 26, n° 4, p. 595-601.
- Friedman, H. H., J. E. Whitney et A. S. Szczesniak. 1963. « The texturometer—A new instrument for objective texture measurement ». *Journal of Food Science*, vol. 28, n° 4, p. 390-396.
- Ganji, F., M. Abdekhodaie et A. Ramazani S.A. 2007. « Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel ». *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 42, n° 1, p. 47-53.
- Golzarian, Jafar, Luc Dussaussois, Kamel Ait Said, Hicham T. Abada, Jean P. Dereume et Julien Struyven. 2002. « Embolization of large aneurysms with long wire coils ». *CardioVascular and Interventional Radiology*, vol. 25, n° 1, p. 26-29.

- Grebien, Craig R., David J. Axelrod, Hearns Charles, Eric J. Gandras, Matthew Bank et Avi Setton. 2009. « Treatment of posttraumatic aortic pseudoaneurysms using detachable hydrogel-coated coils ». *The journal of TRAUMA® injury, infection, and critical care*, vol. 66, n° 6, p. 1735-1738.
- Grisafi, Joseph L., Guillaume Boiteau, Elizabeth Detschelt, Jonathan Potts, Paul Kiproff et Satish C. Muluk. 2010. « Endoluminal treatment of type IA endoleak with Onyx ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 52, n° 5, p. 1346-1349.
- Haddad, Y.M. 1995. *Viscoelasticity of engineering materials*, first edition. Londre, Angleterre: Chapman and Hall, 378 p.
- Hahn, S., Y. J. Kim, W. Kwon, S. W. Cha et W. Y. Lee. 2010. « Comparison of the effectiveness of embolic agents for bronchial artery embolization: gelfoam versus polyvinyl alcohol ». *Korean journal of radiology : official journal of the Korean Radiological Society*, vol. 11, n° 5, p. 542-6.
- Hahne, J. D., C. Arndt, J. Herrmann, B. Schönnagel, G. Adam et C. R. Habermann. 2011. « Follow-up of abdominal aortic aneurysm after endovascular aortic repair: Comparison of volumetric and diametric measurement ». *European Journal of Radiology*, vol. In Press, Corrected Proof.
- Hamidine, M., et M. C Heuzey. 2009. « Systèmes gélifiants de chitosane ». In *Chitine et chitosane: Du biopolymère à l'application*, sous la dir. de Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot, Éric Guibal. p. 107-126. Besançon Cedex: Presse Universitaire de Franche-Comté.
- Hiraki, Takao, Dusan Pavcnik, Barry T. Uchida, Hans A. Timmermans, Qiang Yin, Reng-Hong Wu, Mahtab Niyyati, Frederick S. Keller et Josef Rösch. 2005. « Prophylactic residual aneurysmal sac embolization with expandable hydrogel embolic devices for endoleak prevention: Preliminary study in dogs ». *CardioVascular and Interventional Radiology*, vol. 28, n° 4, p. 459-466.
- Ho, Emily, Anthony Lowman et Michele Marcolongo. 2006. « Synthesis and characterization of an injectable hydrogel with tunable mechanical properties for soft tissue repair ». *Biomacromolecules*, vol. 7, n° 11, p. 3223-3228.
- Horvathy, Denes B., Erik F. Hauck, Christopher S. Ogilvy, L. Nelson Hopkins, Elad I. Levy et Adnan H. Siddiqui. 2011. « Complete preoperative embolization of hemangioblastoma vessels with Onyx 18 ». *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 18, n° 3, p. 401-403.

- Ilieșcu, M., C. D. Hoemann, M. S. Shive, A. Chenite et M. D. Buschmann. 2008. « Ultrastructure of hybrid chitosan–glycerol phosphate blood clots by environmental scanning electron microscopy ». *Microscopy Research and Technique*, vol. 71, n° 3, p. 236-247.
- Jarry, Claire, Cyril Chaput, Abdellatif Chenite, Marie-Alexandrine Renaud, Michael Buschmann et Jean-Christophe Leroux. 2001. « Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels ». *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 58, n° 1, p. 127-135.
- Jarry, Claire, Jean-Christophe Leroux, Jonathan Haeck et Cyril Chaput. 2002. « Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: Effect on thermogelling chitosan- β -glycerophosphate systems ». *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 50, n° 10, p. 1335-1340.
- Jarry, Claire, M. Shive et A. Chenite. 2007. « An injectable biomaterial for bone repair ». In *Materials Science Forum* (2007). Vol. 539-543, p. 535-539.
- Johnston, K. Wayne, Robert B. Rutherford, M. David Tilson, Dhiraj M. Shah, Larry Hollier et James C. Stanley. 1991. « Suggested standards for reporting on arterial aneurysms ». *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, vol. 13, n° 3, p. 452-458.
- Jones, D. S., A. D. Woolfson et J. Djokic. 1996. « Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components ». *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 61, n° 12, p. 2229-2234.
- Jones, David S., Marcos Luciano Bruschi, Osvaldo de Freitas, Maria Palmira Daflon Gremião, Elza Helena Guimarães Lara et Gavin P. Andrews. 2009. « Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity ». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 372, n° 1-2, p. 49-58.
- Jones, David S., Christopher R. Irwin, A. David Woolfson, Jasmina Djokic et Vicky Adams. 1999. « Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis ». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 88, n° 6, p. 592-598.

- Jones, David S., A. David Woolfson, Andrew F. Brown et Michael J. O'Neill. 1997. « Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties ». *Journal of Controlled Release*, vol. 49, n° 1, p. 71-79.
- Jonker, Frederik H. W., John Aruny et Bart E. Muhs. 2009. « Management of type II endoleaks: Preoperative versus postoperative versus expectant management ». *Seminars in Vascular Surgery*, vol. 22, n° 3, p. 165-171.
- Joshi, Abhijeet, Garland Fussell, Jonathan Thomas, Andrew Hsuan, Anthony Lowman, Andrew Karduna, Ed Vresilovic et Michele Marcolongo. 2006. « Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement ». *Biomaterials*, vol. 27, n° 2, p. 176-184.
- Kalyanam, S., R. D. Yapp et M. F. Insana. 2009. « Poro-viscoelastic behavior of gelatin hydrogels under compression-implications for bioelasticity imaging ». *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 131, n° 8, p. 081005 (13 pp.).
- Kasirajan, Karthikeshwar, Brian Matteson, John M. Marek et Mark Langsfeld. 2003. « Technique and results of transfemoral superselective coil embolization of type II lumbar endoleak ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, n° 1, p. 61-66.
- Kirby, Lem, et John Goodwin. 2003. « Treatment of a primary type IA endoleak with a liquid embolic system under conditions of aortic occlusion ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 37, n° 2, p. 456-460.
- Knackstedt, Mark Alexander, Christoph H. Arns, Tim J. Senden et Karlis Gross. 2006. « Structure and properties of clinical coralline implants measured via 3D imaging and analysis ». *Biomaterials*, vol. 27, n° 13, p. 2776-2786.
- Kniemeyer, H. W., T. Kessler, P. U. Reber, H. B. Ris, H. Hakki et M. K. Widmer. 2000. « Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 19, n° 2, p. 190-196.
- Krause, W., et D. Niehues. 1996. « Biochemical characterization of X-ray contrast media ». *Investigative radiology*, vol. 31, n° 1, p. 30-42.
- Kuo, Catherine K., et Peter X. Ma. 2001. « Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties ». *Biomaterials*, vol. 22, n° 6, p. 511-521.

- Lavertu, M. 2007. « Caracterisation du système thermosensible chitosane-glycerol phosphate et applications pour la livraison de gènes ». Ph.D., Canada, Ecole Polytechnique, Montréal (Canada), 228 p.
- Lavertu, Marc, Dominic Filion et Michael D. Buschmann. 2008. « Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation ». *Biomacromolecules*, vol. 9, n° 2, p. 640-650.
- Lee, Hyun, Yeon-Hee Yoon, Woo-Back Lee et Jong-Ki Kim. 2009a. « A gel-forming poly-l-guluronic acid produced from no guluronate-rich marine algae using new hydrolysis method: test for endovascular embolization ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, n° 9, p. 1917-1926.
- Lee, Si-Yuen, Barry P. Pereira, N. Yusof, L. Selvaratnam, Zou Yu, A. A. Abbas et T. Kamarul. 2009b. « Unconfined compression properties of a porous poly(vinyl alcohol)-chitosan-based hydrogel after hydration ». *Acta Biomaterialia*, vol. 5, n° 6, p. 1919-1925.
- Li, Xiaowei, Wenguang Liu, Guixiang Ye, Bingqi Zhang, Dunwan Zhu, Kangde Yao, Zuoqin Liu et Xizhong Sheng. 2005. « Thermosensitive N-isopropylacrylamide-N-propylacrylamide-vinyl pyrrolidone terpolymers: Synthesis, characterization and preliminary application as embolic agents ». *Biomaterials*, vol. 26, n° 34, p. 7002-7011.
- Ling, Adrian J., Rajiv Pathak, Marek Garbowski et Sanjay Nadkarni. 2007. « Treatment of a large type II endoleak via extraperitoneal dissection and embolization of a collateral vessel using ethylene vinyl alcohol copolymer (Onyx) ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 18, n° 5, p. 659-662.
- Loch Macdonald, R., Saied Mojtahedi, Lydia Johns, Andrew Kowalcuk et J. Paul Muizelaar. 1998. « Randomized comparison of guglielmi detachable coils and cellulose acetate polymer for treatment of aneurysms in dogs ». *Stroke*, vol. 29, n° 2 (February 1, 1998), p. 478-486.
- Loffroy, Romaric, et Eric Steinmetz. 2011. « Regarding "Endoluminal treatment of type IA endoleak with Onyx" ». *Journal of Vascular Surgery*, vol. 53, n° 4, p. 1163-1163.
- Loh, Yince, et Gary R. Duckwiler. 2010. « A prospective, multicenter, randomized trial of the Onyx liquid embolic system and N-butyl cyanoacrylate embolization of cerebral arteriovenous malformations ». *Journal of Neurosurgery*, vol. 113, n° 4, p. 733-741.
- Loyd, D J. 1926. « The problem of gel structure. ». In *The colloid chemistry*. Vol. 1, p. 767-782. New-York, USA: J. Alexander. Chemical Catalogue Compagny.

- Malafaya, Patricia B., Tircia C. Santos, Martijn van Griensven et Rui L. Reis. 2008. « Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures ». *Biomaterials*, vol. 29, n° 29, p. 3914-3926.
- Martin, Michael L., Bart L. Dolmatch, Peter D. Fry et Lindsay S. Machan. 2001. « Treatment of type II endoleaks with Onyx ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 12, n° 5, p. 629-632.
- Molyneux, Andrew J., Saruhan Cekirge, Isil Saatci et Gyula Gal. 2004. « Cerebral aneurysm multicenter european Onyx (CAMEO) trial: Results of a prospective observational study in 20 european centers ». *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 25, n° 1 (January 1, 2004), p. 39-51.
- Nair, Lakshmi S., Trevor Starnes, Jia-Wei Kevin Ko et Cato T. Laurencin. 2007. « Development of injectable thermogelling chitosan-inorganic phosphate solutions for biomedical applications ». *Biomacromolecules*, vol. 8, n° 12, p. 3779-3785.
- Natarajan, Sabareesh Kumar, Donald Born, Basavaraj Ghodke, Gavin W. Britz et Laligam N. Sekhar. 2009. « Histopathological changes in brain arteriovenous malformations after embolization using Onyx or N-butyl cyanoacrylate ». *Journal of Neurosurgery*, vol. 111, n° 1, p. 105-113.
- Oowaki, Hisayuki, Shojiro Matsuda, Nobuyuki Sakai, Takayuki Ohta, Hiroo Iwata, Akiyo Sadato, Waro Taki, Nobuo Hashimoto et Ikada Yoshito. 2000. « Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery ». *Biomaterials*, vol. 21, n° 10, p. 1039-1046.
- Parodi, J. C., J. C. Palmaz et H. D. Barone. 1991. « Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms ». *Annals of vascular surgery*, vol. 5, n° 6, p. 491-499.
- Peng, Jiang, Cunyi Wen, Aiyuan Wang, Yu Wang, Wenjing Xu, Bin Zhao, Li Zhang, Shibi Lu, Ling Qin, Quanyi Guo, Limin Dong et Jiemo Tian. 2011. « Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 96B, n° 2, p. 316-325.
- Peynircioğlu, Bora, Barış Türkbeş, Murat Özkan et Barbaros E. Çil. 2008. « Use of glue and microcoils for transarterial catheter embolization of a type 1 endoleak ». *Diagnostic and interventional radiology*, vol. 14, p. 111-115.
- Quireshi, Adnan. I. 2011. *Textbook of interventional neurology*. New-York, États-unis: Cambridge University Press, 506 p.

- Raymond, Jean, Annick Metcalfe, Anne-Cecile Desfaits, Edith Ribourtout, Igor Salazkin, Kevin Gilmartin, Gill Embry et Robert J. Boock. 2003. « Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery ». *American journal of neuroradiology*, vol. 24, n° 6 (June 1, 2003), p. 1214-1221.
- Rinaudo, M. 2008. « Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials ». *Polymer International*, vol. 57, n° 3, p. 397-430.
- Rinaudo, M. 2007. « Properties and degradation of selected polysaccharides: hyaluronan and chitosan ». *Corrosion engineering, science and technology*, vol. 42, n° 4, p. 324-334.
- Rinaudo, M., G. Pavlov et J. Desbrières. 1999. « Solubilization of chitosan in strong acid medium ». *International journal of polymer analysis and characterization*, vol. 5, n° 3, p. 267 - 276.
- Ruel-Gariépy, E., A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis et J. C. Leroux. 2000. « Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs ». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 203, n° 1-2, p. 89-98.
- Ruel-Gariépy, Eve, et Jean-Christophe Leroux. 2004. « In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 58, n° 2, p. 409-426.
- Rusius, Victoria C., Robert S. M. Davies, Jonathan D. Hopkins, Martin J. Duddy et Simon R. G. Smith. 2011. « Successful glue embolization of a late type 1a endoleak causing abdominal aortic aneurysm rupture ». *Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 45, n° 2 (February 1, 2011), p. 198-201.
- Sahani, Dushyant V., Gilles Soulez, Ke-Min Chen, Luigi Lepanto, Jian-Rong Xu, Rendon C. Nelson, Luigi Grazioli, Angelo Vanzulli, Jay P. Heiken et the Investigators of the IMPACT Study. 2007. « A comparison of the efficacy and safety of iopamidol-370 and iodixanol-320 in patients undergoing multidetector-row computed tomography ». *Investigative Radiology*, vol. 42, n° 12, p. 856-861 10.1097/RLI.0b013e3181514413.
- Sergerie, Kim, Marc-Olivier Lacoursière, Martin Lévesque et Isabelle Villemure. 2009. « Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests ». *Journal of Biomechanics*, vol. 42, n° 4, p. 510-516.
- Seron, Aymeric, Laurence Moine, Alexandre Laurent, Michel Wassef, Gérard Guiffant, Patrice Flaud et Denis Labarre. 2009. « An embolic gelling solution based on acrylic copolymers in ethanol for the treatment of arteriovenous malformations ». *Biomaterials*, vol. 30, n° 20, p. 3436-3443.

Société canadienne de chirurgie vasculaire. 2008. « Document d'information sur l'anévrisme aortique abdominale ». En ligne. <http://www.canadianvascular.ca/upload-files/AAA-2_document_info08.pdf>. Consulté le 30 août 2011.

Soga, Youji, Mark C. Preul, Motomasa Furuse, Timothy Becker et Cameron G. McDougall. 2004. « Calcium alginate provides a high degree of embolization in aneurysm models: A specific comparison to coil packing ». *Neurosurgery*, vol. 55, n° 6, p. 1401-1409.

Song, Fei, Li-Ming Zhang, Jun-Fei Shi et Nan-Nan Li. 2010. « Novel casein hydrogels: Formation, structure and controlled drug release ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 79, n° 1, p. 142-148.

Song, Ha-Hun, Yoo-Dong Won et Young-Joo Kim. 2010. « Transcatheter N-butyl cyanoacrylate embolization of pseudoaneurysms ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 21, n° 10, p. 1508-1511.

Soulez, Gilles, Sophie Lerouge, Tim Darsaut, Igor Salazkin, Vincent L. Oliva et Jean Raymond. 2008. « Role of the endothelial lining in endoleak formation and persistence after endovascular repair of aneurysm ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 19, n° 7, p. 1070-1078.

Soulhat, J., M. D. Buschmann et A. Shirazi-Adl. 1999. « A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression ». *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 121, n° 3, p. 340-347.

Stammen, Jason A., Stephen Williams, David N. Ku et Robert E. Guldberg. 2001. « Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression ». *Biomaterials*, vol. 22, n° 8, p. 799-806.

Stavropoulos, S. William, Hans Kim, Timothy W. I. Clark, Ronald M. Fairman, Omaida Velazquez et Jeffrey P. Carpenter. 2005. « Embolization of type 2 endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms with use of cyanoacrylate with or without coils ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 16, n° 6, p. 857-861.

Thompson, M. M. 2003. « Controlling the expansion of abdominal aortic aneurysms ». *British Journal of Surgery*, vol. 90, n° 8, p. 897-898.

van Rooij, W.J., M. Sluzewski et G.N. Beute. 2007. « Brain AVM embolization with Onyx ». *American journal of neuroradiology*, vol. 28, n° 1 (January 1, 2007), p. 172-177.

Wang, Dong. 2000. « Characterization of thermoreversible pH-sensitive physical gels of chitosan ». M.Sc.A. dissertation, Montréal, École Polytechnique, 80 p. ProQuest.

- Wang, Limin, et Jan P. Stegemann. 2010a. « Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with [beta]-glycerophosphate for bone tissue engineering ». *Biomaterials*, vol. 31, n° 14, p. 3976-3985.
- Wang, Limin, et Jan P. Stegemann. 2010b. « Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering ». *Biomaterials*, vol. 31, n° 14, p. 3976-3985.
- Winter, H. Henning. 1987. « Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the G'-G" crossover? ». *Polymer engineering and science*, vol. 27, n° 22, p. 1698-1702.
- Winter, H. Henning, et Francois Chambon. 1986. « Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point ». *Journal of Rheology*, vol. 30, n° 2, p. 367-382.
- Xie, Fan, Pierre Weiss, Olivier Chauvet, Jean Le Bideau et Jean Tassin. 2010. « Kinetic studies of a composite carbon nanotube-hydrogel for tissue engineering by rheological methods ». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 21, n° 4, p. 1163-1168.
- Yang, Xianyan, Yilai Gan, Xin Gao, Li Zhao, Changyou Gao, Xinli Zhang, Yanbo Feng, Kang Ting et Zhongru Gou. 2010. « Preparation and characterization of trace elements-multidoped injectable biomimetic materials for minimally invasive treatment of osteoporotic bone trauma ». *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 95A, n° 4, p. 1170-1181.
- Zhao, Lingling, Lijun Zhu, Fuyong Liu, Chenyang Liu, Dan Shan, Qian Wang, Chengliang Zhang, Jiaoli Li, Jiguang Liu, Xiaozhong Qu et Zhenzhong Yang. 2011. « pH triggered injectable amphiphilic hydrogel containing doxorubicin and paclitaxel ». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 410, n° 1-2, p. 83-91.