

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR_S1255 : Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines :
hémostase, thrombose, transfusion

THÈSE

Présentée par

Axelle Y. KERN

Soutenue le **17 septembre 2024**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/S spécialité : Hématologie et physiopathologie vasculaire

**La thrombose de stent : évaluation de
l'importance de la rhéologie dans la
thrombogénicité des stents et d'un nouvel agent
pharmacologique dirigé contre la GPVI pour
prévenir la thrombose de stent**

THÈSE dirigée par :

M. Pierre H. MANGIN

DR2, INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Cécile OURY

DR, FNRS, Université de Liège

M. Benoît HO-TIN-NOE

DR2, INSERM, Université Paris Cité

EXAMINATEUR :

Mme Valérie WOLFF

PU-PH, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

« Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostase, thrombose, transfusion »

Directeur : Docteur Pierre H. MANGIN

Établissement Français du Sang (EFS) – Grand Est

10, rue Spielmann, BP 36, F-67065 Strasbourg Cedex, France

Tel : +33 3 88 21 25 25, Fax : +33 3 88 21 25 21

Directeur de thèse :

Docteur Pierre H. MANGIN

E-mail : pierre.mangin@efs.sante.fr

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement **Pierre Mangin** de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse sous sa supervision. Merci de m'avoir si rapidement intégrée à ton équipe avec laquelle j'ai énormément appris. Merci pour tes conseils, ton soutien et tes encouragements tout au long de mon master puis de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à **Christian Gachet**, ancien directeur de l'unité 1255 et de l'EFS Grand Est, qui m'a permis d'intégrer le laboratoire lors de mon Master 1 et de poursuivre avec une thèse dans cet environnement pluridisciplinaire enrichissant.

À l'**Université de Strasbourg** et la **fondation Pierre et Jeanne Spiegel** qui m'ont financée, je leur en suis infiniment reconnaissante.

Je remercie sincèrement **Benoît Ho-Tin-Noé**, **Cécile Oury** et **Valérie Wolff** pour avoir accepté de siéger dans mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également les Drs **Raoul Pop** et **Salomé Kuntz** d'avoir répondu à toutes mes questions et de m'avoir laissé assister à une opération d'endartériectomie avec stenting au bloc.

Un immense merci à **Lise** pour les manipes que j'ai pu te confier en toute sérénité, pour celles qu'on a pu faire ensemble et pour ta bonne humeur constante. Merci pour ces discussions sur nos voyages qui nous ont fait rêver ! Merci aussi d'avoir relu cette thèse, afin de vérifier que tout est à la bonne place.

Merci aux membres de notre "petite" **team PM**. Nous étions six quand j'ai commencé ma thèse, aujourd'hui nous sommes une équipe de treize personnes (sans compter les stagiaires) ! Merci à **Emily**, **Catherine B.** et **Clarisse**, pour leur aide précieuse quand j'étais perdue sur une manipe ou un protocole, pour répondre à mes questions plus ou moins bêtes et tous leurs conseils avisés depuis mon arrivée en M1. Merci pour ces vacances au ski ou en Thaïlande, qui m'ont permis de penser à autre chose que la thèse.

Merci à l'**équipe de l'animalerie** pour votre soutien quand je me suis mise à *l'in vivo*. Merci au **labo plaquettes** et tout particulièrement à **Véro** de m'avoir appris à laver des plaquettes, mais surtout d'avoir accepté que je vampirise une bonne partie de la liste des donneurs pendant plus de trois ans ! Merci aussi à **Jean-Yves** de m'avoir montré les bases en microscopie électronique. Merci aussi à **Catherine S.** de m'avoir épaulée pour ma première présentation de vulgarisation scientifique, ce n'est pas aussi simple que ça en a l'air. Je

remercie également l'ensemble des membres du laboratoire qui, de près ou de loin, m'ont soutenue pendant ces cinq années passées ici.

Un grand merci à mes collègues de bureau, anciens ou actuels : **Quentin, Rémi, Sasha, Andrei, Kim** et surtout **Florian**, qui m'a supportée avec mes incessantes questions.

Je tiens aussi à remercier ma professeure de SVT, **Mme Leber**, qui m'a donné le goût de la biologie à un moment où il était compliqué de savoir quelles études je voulais suivre.

Je souhaite aussi remercier mes amis et collègues de la Protection Civile du Bas-Rhin : **Tommy, Eliza, Romain, Florian, Diogo** (et de la Nièvre : **Bernadette**). Les discussions sur nos différents postes, surtout ceux qui commencent à pas d'heure le matin, m'ont permis de me focaliser sur autre chose que la thèse, ce qui m'a été bénéfique. Merci aussi pour ces dix jours aux JO de Paris, qui ont été très fatigants, mais si enrichissants (merci aussi de m'avoir laissé travailler sur les postes plus calmes).

Merci à mes amis d'enfance : **Claire, Maxime, Marine, Mathieu**, pour ces week-ends d'évasion à Amsterdam, Angers, Berlin ou au ski. Merci aussi pour les sorties quand je revenais à la maison. Merci à mes amis de Strasbourg pour les soirées et les randonnées : **Paul, Lucas, Louise, Valentin, Marion, Amélie, Anne-Cécile, Jean...** Un immense merci à Paul, Gaël et Lucas pour cette pause japonaise extraordinaire et nécessaire qui a été ma première déconnexion totale depuis le début de ma thèse. Merci aussi à mes 'sœurs' **Léa, Charlotte** et **Lisa** de prendre des nouvelles régulièrement, on se fera un brunch à l'occasion !

Je remercie aussi ma **marraine**, mes oncles **Pierre** et **Philippe** et mes cousines **Sophie** et **Hélène** qui m'ont encouragée et incitée à prendre du recul sur mes études et mon avenir.

Merci à **mes parents et mon frère** pour votre soutien, vous êtes toujours là quand il faut. Maman, merci pour ces années de relecture de PowerPoint, de mémoires, de rapports et surtout d'avoir relu cette thèse ! A Louis, courage, tu as bientôt fini ton mémoire !

Enfin, merci à toi **Gaël**, de m'avoir motivée à continuer en thèse quand je doutais après mon Master. Merci de me supporter depuis de nombreuses années, je sais que, vivant à la fois à cent à l'heure et comme une mamie, je ne suis pas toujours facile à suivre. Dernière ligne droite pour ta thèse toi aussi, courage !

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
PRÉAMBULE	1
Rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire.....	3
L'hémostase secondaire et tertiaire.....	3
La thrombose artérielle	4
Les stents.....	5
La rhéologie.....	6
Contexte de la thèse	6
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I. Le système vasculaire	11
A. Physiologie de l'artère saine	11
B. Anatomie de l'artère saine.....	13
1. Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes.....	13
2. La matrice extracellulaire.....	16
II. L'hémostase.....	23
A. L'hémostase primaire et la plaquette sanguine.....	23
1. Définition et structure de la plaquette	23
2. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire	25
3. Les récepteurs plaquettaire.....	26
3.1. Les récepteurs d'adhérence et d'activation.....	26
3.1.1. Le complexe GPIb-IX-V	26
3.1.2. La GPVI.....	28
3.1.3. Les intégrines.....	31
3.2. Les récepteurs aux agonistes solubles	35
3.2.1. Le récepteur P2X ₁	35
3.2.2. Les récepteurs couplés aux protéines G	35
B. La coagulation	39
C. La fibrinolyse	41
III. Introduction à la rhéologie sanguine.....	43
A. Les paramètres hémodynamiques majeurs	43
B. Rôle du flux sanguin dans la régulation de l'hémostase.....	45

C. Modification de l'écoulement sanguin dans une sténose et impact sur la thrombose	46
D. Modification de l'écoulement sanguin lors de l'implantation d'un dispositif endovasculaire	47
IV. La thrombose artérielle	49
A. L'athérogénèse	49
B. Prévention et traitements de la thrombose artérielle	52
1. L'approche pharmacologique	53
1.1. L'aspirine	54
1.2. Les antagonistes du récepteur P2Y ₁₂	54
1.3. La bithérapie antiplaquettaire	55
1.4. Les antagonistes de l'intégrine α IIb β 3	56
2. Les nouveaux traitements antiplaquettaires	56
2.1. Les inhibiteurs de l'axe GPIIb/IIIa	56
2.2. Les inhibiteurs de la GPVI	57
2.3. Les inhibiteurs des récepteurs PAR	58
3. Les approches endovasculaires et chirurgicales	60
3.1. L'approche endovasculaire	60
3.2. L'approche chirurgicale	61
V. Les stents	63
A. Définition et évolution du stent	63
B. Caractéristiques thrombogènes des stents	64
1. L'importance du matériau	65
2. L'importance du design	67
3. L'importance du coating	70
3.1. Les coating passifs	70
3.1.1. Les coating inorganiques	71
3.1.2. Les coating organiques	72
3.2. Les coating actifs	74
3.2.1. Les agents antiprolifératifs	75
3.2.2. Les agents antithrombotiques et antiinflammatoires	76
3.2.3. Les agents cicatriciels	77
C. Modèles pour étudier la thrombogénicité des stents	78
1. Le système Chandler Loop	79
2. La chambre de perfusion annulaire	80
3. Le système de perfusion circulaire de paillasse	81
4. Le système de perfusion Haemobile	82
5. Le modèle de perfusion <i>ex vivo</i> par shunt artério-veineux carotide-jugulaire	83

VI. La thrombose de stent	85
A. Définition	85
B. Épidémiologie	86
C. Étiologie	86
1. Les caractéristiques du patient	87
2. La lésion vasculaire	87
3. La procédure d'angioplastie avec pose de stent	88
4. Le stent.....	88
5. Le traitement antithrombotique.....	89
6. La cicatrisation et la sensibilité du vaisseau	89
D. Prévention et traitements	89
1. Prévention.....	89
2. Traitements.....	90
E. Pronostic	91
Problématisation du sujet de thèse et principaux objectifs	93
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	95
<u>Publication 1</u> : Critical analysis of <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> experimental models investigating the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents.....	97
<u>Publication 2</u> : A macrofluidic model to investigate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents and develop less thrombogenic stents	113
<u>Publication 3</u> : High shear environment precipitates carotid stent thrombosis in patients with tandem lesions	127
<u>Publication 4</u> : Stent thrombogenicity, design matters: the wire crossings of braided stents are highly thrombogenic	165
<u>Publication 5</u> : Carotid single- and dual-layer stents reduce the wall adhesion of platelets by influencing flow and cellular transport	197
<u>Publication 6</u> : Targeting GPVI to prevent stent thrombosis.....	219
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	247
BIBLIOGRAPHIE	259

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Schéma général de la structure des artères.....	12
<u>Figure 2</u> : Structure de la triple hélice du collagène.....	17
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de la structure du monomère de FW.....	19
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de la structure du fibrinogène.....	20
<u>Figure 5</u> : Représentation schématique de la structure de la fibronectine.....	21
<u>Figure 6</u> : Schéma représentatif de la composition d'une plaquette humaine.....	24
<u>Figure 7</u> : Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire.....	26
<u>Figure 8</u> : Structure du complexe GPIb-IX-V.....	27
<u>Figure 9</u> : Structure de la GPVI.....	29
<u>Figure 10</u> : Voie de signalisation de la GPVI.....	30
<u>Figure 11</u> : Représentation schématique de la cascade de coagulation.....	39
<u>Figure 12</u> : Représentation schématique de la fibrinolyse.....	41
<u>Figure 13</u> : Comportement d'un fluide non-newtonien en fonction du taux de cisaillement....	43
<u>Figure 14</u> : Schématisation du profil de vitesse du sang suivant une loi de Poiseuille.....	44
<u>Figure 15</u> : Schématisation de l'écoulement des flux en présence d'une sténose.....	46
<u>Figure 16</u> : Schéma du développement et de la progression d'une plaque athérosclérose.....	51
<u>Figure 17</u> : Les mécanismes moléculaires de la thrombose artérielle.....	52
<u>Figure 18</u> : Mécanismes d'action des antiplaquettaires utilisés en clinique et en cours de développement.....	53
<u>Figure 19</u> : Les principales techniques chirurgicales de revascularisation.....	60
<u>Figure 20</u> : Les principales complications de la pose d'un stent.....	63
<u>Figure 21</u> : Les principales caractéristiques thrombogènes des stents.....	68
<u>Figure 22</u> : Les principaux outils pour évaluer la thrombogénicité des stents.....	78
<u>Figure 23</u> : Les facteurs majeurs responsables de la thrombose de stent.....	87

Liste des tableaux

<u>Table 1</u> : Les différentes catégories de thrombose de stent.....	85
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADAMTS13	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat 13</i>
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AINS	Agents antiinflammatoires non stéroïdiens
AIT	Accident ischémique transitoire
AOMI	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ApoE	Apolipoprotéine E
ARC	Consortium de recherche académique
Arg	Arginine
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AVC	Accident vasculaire ischémique
BMS	<i>Bare metal stent</i> : stent en métal nu
Btk	Protéine kinase de Bruton
Ca²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CE	Cellules endothéliales
CML	Cellules musculaires lisses
COX	Cyclooxygénase
CPA	Chambre de perfusion annulaire
DAG	Diacylglycérol
DES	<i>Drug eluting stent</i> : stent à élution médicamenteuse
DRP	Domaine riche en proline
EDA	Extra-domaine A
EDB	Extra-domaine B
F	Facteur
FcRγ	Chaîne γ des récepteurs Fc
Fg	Fibrinogène
FN	Fibronectine
FpA	Fibrinopeptide A
FpB	Fibrinopeptide B
FNI	Domaine de type I
FNII	Domaine de type II
FNIII	Domaine de type III
FT	Facteur tissulaire
FW	Facteur Willebrand

GFOGER	Séquence glycine – phénylalanine – pyrrolisine – glycine - acide glutamique – arginine
Gly	Glycine
GP	Glycoprotéine
GPO	Motif glycine – proline – hydroxyproline
GR	Globules rouges
Hyp	Hydroxyproline
Ig	Immunoglobuline
IM	Infarctus du myocarde
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LEE	Limitante élastique externe
LEI	Limitante élastique interne
LM	Laminines
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
MEC	Matrice extracellulaire
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phosphorylation
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAI-1	Activateur du plasminogène de type I
PAR	<i>Proteinase Activated Receptors</i>
PC	Phosphorylcholine
PCI	Intervention coronaire percutanée
PCL	Polycaprolactone
PCP	Système de perfusion circulaire de pailasse
PDF	Produits de dégradation de la fibrine
PETP	Polyéthylène téréphtalate
PG	Prostaglandine
PGA	Acide polyglycolique
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phospho-inositol-4,5-bisphosphate
PL	Phospholipase
PLA	Acide poly-L-lactique
PLA2	Phospholipase A2
PLCy2	Phospholipase Cy2
PM	Phospholipides membranaires

Pro	Proline
PRP	Plasma riche en plaquettes
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PTFEP	Poly-bis-trifluoro-éthoxyphosphazène
PTT	Purpura thrombotique thrombopénique
PU	Polyuréthane
PVC	Chlorure de polyvinyle
PVDF-HFP	Polyfluorure de vinylidène-co-hexafluoropropène
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RGD	Séquence arginine – glycine – asparagine
S	Pont disulfure
SAV	Shunts artério-veineux
SCL	Système Chandler Loop
SiC	Carbure de silicium
SPH	Système de perfusion Haemobile
SR	<i>Shear rate</i> : taux de cisaillement
SS	<i>Shear stress</i> : contrainte de cisaillement
T	Transducteur
TA	TxA2 synthase
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TiNOX	Nitride de titane
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
TS	Thrombose de stent
TSP-1	Thrombospondine-1
TxA2	Thromboxane A ₂
uPA	Urokinase
V	Région variable
VE-cadhérines	Cadhérines endothéliales vasculaires
VEGF	Facteurs de croissance endothéliaux vasculaires
V_{max}	Vitesse maximale au centre du vaisseau
V₀	Vitesse minimale à la paroi
WSR	<i>Wall shear rate</i> : taux de cisaillement à la paroi
WSS	<i>Wall shear stress</i> : contrainte de cisaillement à la paroi
Y	Tyrosine

PRÉAMBULE

Rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire

Les plaquettes sont des fragments de cellules anucléés issus de la fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles sont de très petite taille, entre 2 et 3 μm de diamètre, et ont une morphologie discoïde. Elles circulent librement dans le sang et jouent un rôle-clé dans l'hémostase. Il s'agit d'un processus physiologique complexe et finement régulé qui contribue au maintien de l'intégrité vasculaire et assure l'arrêt des saignements à la suite d'une lésion vasculaire afin de rétablir une circulation sanguine normale. Trois phases de l'hémostase sont différenciées : l'hémostase primaire, secondaire (coagulation) et tertiaire (fibrinolyse).

La libération d'agents vasoconstricteurs, tels que la sérotonine et le thromboxane A_2 (TxA_2) à partir des plaquettes et des cellules endothéliales (CE), couplée à la diminution de la sécrétion d'agents vasodilatateurs, comme la prostacycline et le monoxyde d'azote (NO), entraînent une vasoconstriction pour limiter le débit sanguin et donc la perte sanguine. La lésion du vaisseau expose également des protéines adhésives du sous-endothélium, telles que le facteur Willebrand (FW), les laminines (LM), la fibronectine (FN) et le collagène. En conditions de flux élevés, le FW recrute les plaquettes par l'interaction avec le complexe glycoprotéique (GP) Ib-IX-V. L'adhérence stable des plaquettes est assurée par l'interaction entre les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ et leurs ligands sous-endothéliaux respectifs, à savoir le collagène, la fibronectine et les laminines. La liaison entre le collagène sous-endothélial et la GPVI initie une forte activation plaquettaire, permettant la libération d'agonistes solubles par les granules plaquettaires tels que l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) et l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), ainsi que la sécrétion de TxA_2 . Via leurs récepteurs respectifs, ces agonistes solubles amplifient l'activation des plaquettes et permettent le changement de conformation de l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, augmentant ainsi son affinité pour son ligand principal, le fibrinogène soluble, ce qui assure l'agrégation des plaquettes entre elles et la formation du clou hémostatique.

L'hémostase secondaire et tertiaire

L'hémostase secondaire, appelée aussi coagulation, a pour but de consolider le clou plaquettaire en transformant le fibrinogène en fibrine. La cascade de coagulation est initiée

par le facteur tissulaire (FT) exposé par les CE vasculaires lésées. Elle est amplifiée par les plaquettes procoagulantes exprimant de la phosphatidylsérine chargée négativement à leur surface, ce qui permet le recrutement des facteurs de coagulation. Deux voies de coagulation coexistent : la voie intrinsèque, activée par le facteur XII, et la voie extrinsèque, activée par la FT. Elles conduisent toutes deux à la génération du facteur X qui débute la voie commune de la coagulation. Le facteur X clive la prothrombine en thrombine qui clive quant à elle le fibrinogène plasmatique soluble en un réseau de fibrine insoluble qui renforce et stabilise le clou plaquettaire. La thrombine est également le plus puissant activateur plaquettaire permettant la rétraction de l'agrégat fibrino-plaquettaire en un clou compact, résistant et étanche, stoppant le saignement.

Par la suite, la fibrinolyse est activée à la surface de l'agrégat. Elle permet la transformation du plasminogène inactif en plasmine par l'urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire (tPA). La plasmine est une protéase qui clive la fibrine, ce qui permet la dissolution du clou hémostatique et la restauration d'un flux sanguin normal dans le vaisseau.

La thrombose artérielle

Les plaquettes jouent également un rôle majeur dans la thrombose artérielle, qui survient dans un contexte pathologique, au niveau d'une artère présentant une plaque d'athérosclérose. À la suite de la rupture d'une plaque d'athérosclérose, de nombreuses protéines hautement thrombogènes, telles que le collagène fibrillaire de type I et III, le FW et des lipides sont exposées. Celles-ci permettent aux plaquettes d'adhérer, de s'activer et d'agréger pour mener à la formation d'un thrombus blanc, riche en plaquettes et en fibrine. Ce thrombus peut occlure l'artère soit au niveau de la lésion, soit en aval suite au détachement d'un fragment qui embolise. Ce processus entraîne alors des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde (IM), l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). Les maladies cardiovasculaires et leurs complications représentent aujourd'hui la première cause de mortalité et de handicap acquis de l'adulte dans le monde. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de décès d'origine cardiovasculaire est estimé à 17,9 millions en

2019, soit 32% de la mortalité mondiale totale, dont 15 millions (85 %) dus à des pathologies coronariennes et des AVC.

Pour prévenir et/ou traiter la thrombose artérielle, des agents antiplaquettaires ont été développés. Les quatre principales classes d'agents antiplaquettaires comprennent l'aspirine, les antagonistes du récepteur P2Y₁₂, les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui sont utilisés en cliniques, et un antagoniste du récepteur PAR-1 (vorapaxar) qui a une autorisation de mise sur le marché, mais qui n'est pas utilisé. Ces agents ont contribué à réduire considérablement le risque d'événements ischémiques, mais leur utilisation engendre un risque accru de saignement. C'est pourquoi le traitement classique, à savoir la bithérapie antiplaquettaire, combinant l'aspirine avec un antagoniste P2Y₁₂, ne peut pas être utilisé chez un patient dont le risque hémorragique est élevé ou à la suite d'un AVC, afin d'éviter les saignements intracrâniens qui sont très délétères. Par ailleurs, si l'évènement ischémique est lié à la sténose d'un vaisseau par une plaque d'athérosclérose, une angioplastie est souvent réalisée pour rouvrir le vaisseau à l'aide d'un ballonnet. Dans la majorité des cas, un stent est inséré afin de maintenir le vaisseau ouvert et permettre une recirculation sanguine normale.

Les stents

Un stent est un dispositif endovasculaire, consistant en un fin tube expansible en métal ou en polymère biocompatible. Inséré dans un vaisseau sténosé, il permet de maintenir le vaisseau ouvert afin de lui redonner une forme qui rétablit un flux sanguin normal. Il a été montré depuis plusieurs décennies que les stents possèdent une thrombogénicité intrinsèque. Ainsi, dès le début, les industriels n'ont eu de cesse d'améliorer les stents afin de réduire cette thrombogénicité, notamment en modifiant le matériau et le design, les deux principaux déterminants de la thrombogénicité intrinsèque des stents. Initialement fabriqués en acier inoxydable, les stents sont aujourd'hui principalement composés d'alliages de titane ou de cobalt pour favoriser leur biocompatibilité et leurs propriétés mécaniques. De plus, la surface du matériau a également été améliorée pour éviter une surface rugueuse qui est plus sujette à la thrombogénicité. Pour le design des stents, les paramètres principaux modifiés sont les cellules des stents (ouvertes ou fermées), l'épaisseur et l'espacement des mailles du stent et leur superposition, notamment avec l'apparition des stents bicouches. Un troisième

paramètre est récemment entré en jeu, le coating. Le développement de stents à élution médicamenteuse, par rapport aux stents classiques en métal nu, a ouvert la voie à un coating des stents avec divers agents passifs ou actifs, permettant d'optimiser la cicatrisation du vaisseau ou d'interférer directement avec divers processus biologiques, tels que la réendothélialisation, l'inflammation ou encore la thrombose.

La rhéologie

La rhéologie joue un rôle central dans la régulation de l'hémostase et de la thrombose artérielle. En effet, le flux sanguin régule toutes les étapes de formation d'un clou plaquettaire à savoir l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes. Il impacte notamment le complexe GPIIb-IIIa, un mécanorécepteur essentiel pour l'adhérence et l'agrégation des plaquettes en conditions de flux élevés. Par ailleurs, il dilue les agonistes solubles tels que l'ADP, l'ATP et le TxA₂, suite à leur libération par les plaquettes activées, ce qui réduit leur potentiel d'amplification de l'activation plaquettaire. Lors de l'agrégation, le flux exerce des forces sur le thrombus, ce qui tend à entraîner sa désagrégation avant qu'il ne soit consolidé. De même, les perturbations du flux sont importantes dans la thrombose artérielle, car cette dernière se produit dans une artère sténosée qui modifie l'hémodynamique locale. On retrouve une accélération du flux dans la zone pré-sténotique, des vitesses d'écoulement extrêmes dans la gorge de la sténose et une zone de recirculation dans la région post-sténotique. Ces altérations ont un impact majeur sur l'activation des plaquettes et la formation du thrombus.

Contexte de la thèse

Une complication peu courante, mais extrêmement grave de la pose d'un stent dans un vaisseau est la thrombose de stent, fatale dans 10 à 40 % des cas. L'objectif central de mon travail de thèse a consisté à déterminer les mécanismes mis en jeu dans la thrombose de stent afin de mieux la prévenir dans différents territoires vasculaires (carotidien, coronarien, fémoral). Les modèles expérimentaux actuels permettent d'étudier la thrombogénicité des stents coronariens, mais ils ne sont pas adaptés aux stents d'autres territoires. De plus, ils ont de nombreuses limites et ne sont pas adaptés à l'étude de la thrombose de stent, qui survient

non seulement sur un stent, mais également sur les protéines thrombogènes d'une plaque (Kern et Mangin, ESVB Congress Book, 2023). Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai développé des chambres en élastomère de silicone capables de mimer n'importe quel territoire vasculaire, dont l'artère carotide, coronaire ou fémorale humaine en respectant l'échelle des vaisseaux humains. La chambre est insérée dans un système de flux clos permettant de faire circuler du sang humain anticoagulé à l'aide d'une pompe péristaltique pour mimer des flux retrouvés chez les patients (Kern *et al*, Heliyon, 2024). Ce dispositif a servi à étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents carotidiens utilisés en clinique, et j'ai pu montrer la présence d'une région fortement thrombogène au niveau de la bifurcation de la carotide, là où le stent coupe le flux sanguin (Kern *et al*, Advanced Sciences, soumis). Au cours d'une seconde étude, j'ai identifié des caractéristiques thrombogènes au niveau des intersections des mailles du stent qui génèrent des flux perturbés facilitant la thrombose (Kern *et al*, en cours de rédaction). Dans le cadre d'une collaboration combinant une approche expérimentale et numérique, j'ai pu mettre en lumière un effet antithrombotique de certaines mailles de stents dans le processus de thrombose de stent, par leur impact sur la recirculation des cellules sanguines (Spieker, Kern *et al*, Computers in Biology and Medicine, soumis). Enfin, j'ai mis au point un modèle de thrombose de stent carotidien et fémoral dans le système macrofluidique, qui combine la présence de matériel de plaque avec la présence d'un stent. Ce modèle a permis de montrer que le glenzocimab, un agent anti-GPVI, peut être un candidat-médicament dans la prévention de la thrombose de stent (Kern *et al*, en cours de rédaction).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le système vasculaire

Le rôle principal du système vasculaire est d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires aux différents organes ainsi que d'éliminer les déchets métaboliques. Trois grands types de vaisseaux sont généralement distingués : les artères, les veines et les capillaires, chacun ayant des spécialisations propres à différents niveaux de l'arbre vasculaire. Dans l'ensemble, les composants cellulaires sont les mêmes, mais leur organisation et leur proportion diffèrent selon le vaisseau.

Les artères ont pour rôle de distribuer le sang oxygéné des poumons au cœur, puis vers les différents organes, tandis que les veines apportent le sang désoxygéné vers les poumons, permettant de décharger le dioxyde de carbone et recevoir de l'oxygène. Les capillaires sont, quant à eux, de petits vaisseaux sanguins, situés entre les artères et les veines, qui distribuent le sang aux organes.

A. Physiologie de l'artère saine

Les parois des artères sont composées de trois couches monocentriques : l'intima, la média et l'adventice [1,2]. L'intima, la couche la plus interne, est au contact du sang et contribue à l'étanchéité du vaisseau [2]. Elle est constituée d'une monocouche de CE reposant sur la membrane basale, composée notamment de collagènes de type IV, de laminines et de protéoglycanes [1–4]. La média est composée de cellules musculaires lisses (CML), entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) riche, composée notamment de collagènes, fibres élastiques et protéoglycanes [2–4]. La présence de CML permet la vasoconstriction ou la vasodilatation pour ajuster la pression artérielle dans les vaisseaux selon le besoin [1,3]. L'adventice, la couche la plus externe, est quant à elle composée de fibroblastes, de nerfs, de microvaisseaux et de fibres de collagène de type I et III [2–4]. Cette dernière est cruciale pour maintenir le diamètre des vaisseaux et les empêcher de trop se dilater sous l'effet de la pression artérielle à laquelle ils sont soumis [3]. Les trois couches sont séparées les unes des autres respectivement par une limitante élastique interne (LEI) et une externe (LEE) acellulaires [2,4] (**Figure 1**).

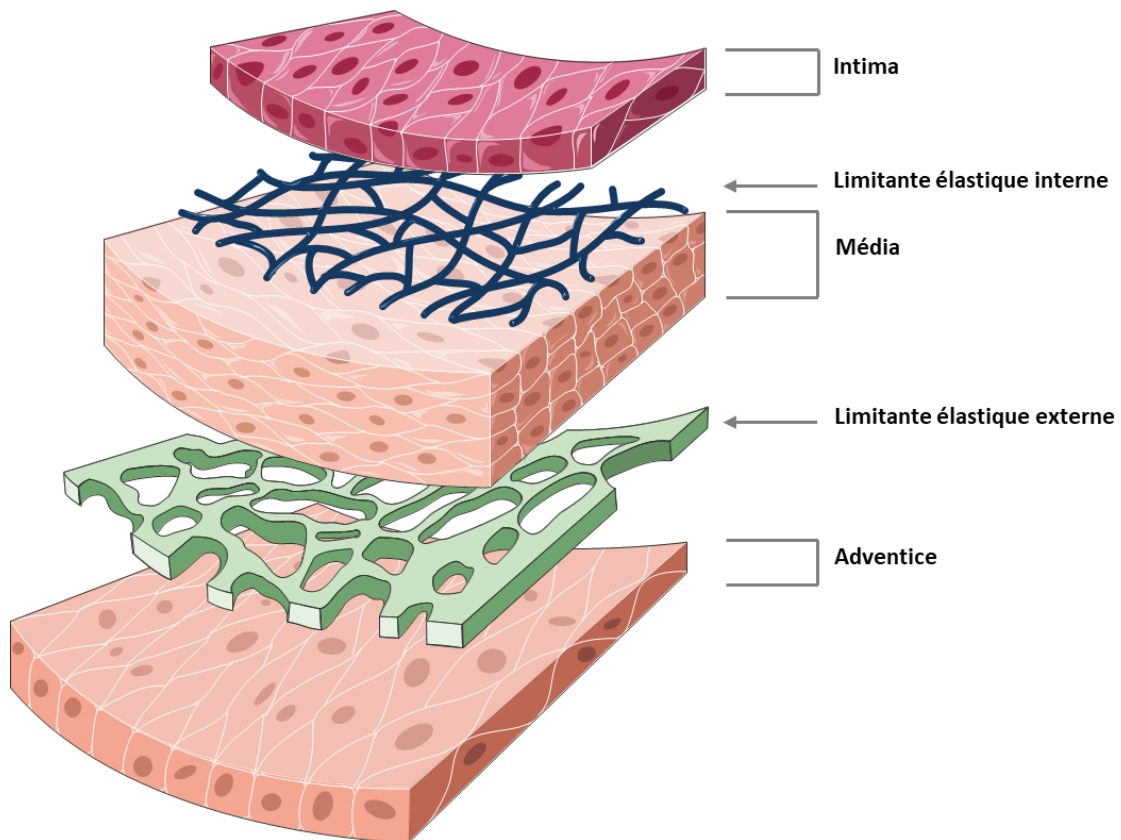


Figure 1 : Schéma général de la structure des artères

Le système artériel distribue le sang oxygéné des poumons au cœur puis aux différents organes [1]. Trois types d'artères sont distinguées, avec des fonctions légèrement différentes : les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles. Les artères élastiques, telles que l'aorte et ses branches (artères carotides communes et subclavières, tronc brachiocéphalique), sont les vaisseaux les plus larges du corps humain [5,6]. À la sortie du cœur, l'aorte et ses branches ont pour rôle de transformer le flux sanguin intermittent en un flux continu et pulsatile [6]. Ces artères ont une média épaisse contenant une quantité importante de fibres élastiques, mais elles sont pauvres en CML [6–8]. Les artères musculaires, par exemple les artères coronaires et carotides internes et externes, se ramifient à partir des branches de l'aorte [5,6]. Elles possèdent d'importantes propriétés vasomotrices leur permettant d'adapter la distribution du sang aux besoins des organes [5,9]. Elles sont composées de nombreuses CML, avec peu de fibres élastiques [5,6,8,9]. Les artérioles, quant à elles, permettent de répondre aux besoins des différents tissus pour distribuer l'oxygène et les nutriments [5,7]. Elles régulent également le débit et sont ainsi responsables de la

résistance périphérique permettant de diminuer la pression sanguine arrivant aux capillaires [6,7]. Elles sont composées d'une média pauvre en fibres élastiques possédant une à trois couches de CML et d'une adventice composée uniquement d'une couche de fibres de collagène et de fibres élastiques [5,7,8].

B. Anatomie de l'artère saine

La paroi des artères est composée notamment de CE, de CML et de fibroblastes, eux-mêmes entourés par une matrice extracellulaire.

1. Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes

1.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent l'endothélium qui est une monocouche de cellules tapissant la face interne des vaisseaux sanguins [10–12]. Ce sont des cellules aplaties et polarisées, c'est-à-dire ancrées sur une lame basale et en contact avec le sang au niveau apical [11,12].

Les différentes propriétés de l'endothélium

L'endothélium contribue aux échanges gazeux et de nutriments entre le sang et les organes [11,12]. La perméabilité de l'endothélium est assurée à la fois par les jonctions serrées et les jonctions adhérentes [11]. Les jonctions serrées (occludines et claudines) forment une barrière possédant une perméabilité sélective qui régule les échanges entre le sang et les différents tissus [13,14], tandis que les jonctions adhérentes, majoritairement composées de cadhérines endothéliales vasculaires (VE-cadhérines), assurent la résistance mécanique de l'endothélium en permettant l'adhérence des CE entre elles [10,11,15].

Par ailleurs, les CE sont le siège d'une activité synthétique, métabolique et sécrétoire importante [12]. En effet, elles sont capables de produire et sécréter par exocytose la plupart des composants de la membrane basale et du sous-endothélium, dont le FW, les collagènes, la fibronectine et les laminines [12,16–18]. Le FW est également retenu dans les corps de

Weibel-Palade, granules de stockage retrouvées dans les CE, qui sont sécrétés dans le sang après activation de ces dernières, lors d'une lésion de la paroi vasculaire [19]. De plus, les CE produisent divers vasodilatateurs tels que la prostaglandine (PG) I₂ et le monoxyde d'azote (NO), mais également des vasoconstricteurs incluant l'endothéline et l'angiotensine II, ce qui régule le tonus vasculaire, en constante balance entre constriction et dilatation [10–12,20].

Les propriétés anti- et prothrombotiques de l'endothélium

Les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Elles synthétisent à la fois des substances anti- et prothrombotiques. Les agents antithrombotiques ont pour fonction première de faciliter l'écoulement sanguin à l'état physiologique [21–23].

La fonction antithrombotique permet de prévenir l'activation des plaquettes, notamment par la production de NO et de PGI₂ qui conduisent respectivement à la formation de GMPc et d'AMPc, inhibant les fonctions plaquettaires en parant le relargage intracellulaire de calcium (Ca²⁺) [11,21,22,24,25]. Le glycocalyx, un film riche en protéines glycolysées, joue également un rôle important en empêchant le sang d'être en contact direct avec la surface apicale des CE, grâce à sa structure chargée et complexe qui agit comme un tamis. La charge négative du glycocalyx repousse les cellules chargées négativement, telles que les globules blancs et rouges, et les plaquettes [11,22,26]. La fonction antithrombotique de l'endothélium prévient aussi la coagulation, notamment par l'expression à leur surface d'héparane sulfate qui potentialise l'activité de l'antithrombine III, et par l'expression de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) limitant la génération de thrombine [20–22,27,28]. Enfin, elle favorise la fibrinolyse, notamment par la libération d'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), une protéase transformant le plasminogène en plasmine responsable de la dégradation de la fibrine [20–22,29].

La fonction prothrombotique de l'endothélium est quant à elle initiée lorsqu'un stimulus active les CE. Ce stimulus peut être physique (apparition d'une brèche vasculaire, rupture d'une plaque d'athérosclérose), inflammatoire (cytokines, endotoxines) ou encore métabolique (lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées) [10,20,22]. Après activation, les CE libèrent le contenu des corps de Weibel-Palade, dont du FW et de la P-sélectine, ce qui

permet l'adhérence des plaquettes par les interactions GPIIb/IIIa/FW et GPIIb/IIIa/P-sélectine [11,22,30,31]. Les CE sécrètent également du platelet-activating factor (PAF) et du TxA₂ qui augmentent le potentiel d'agrégation des plaquettes ainsi que de l'endothéline I et de l'angiotensine II aux propriétés vasoconstrictrices [11,21,22,32]. Enfin, les cellules endothéliales activées exposeraient également du FT activant la cascade de coagulation ; cependant, ceci a été montré *in vitro* et n'est retrouvé *in vivo* que dans certaines conditions précises, telles qu'en présence d'un sepsis sévère chez les babouins ou en présence de tumeurs chez l'Homme [10,11,22,33]. Enfin, la sécrétion de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) réduit l'activité fibrinolytique [21,22,34].

1.2. Les cellules musculaires lisses

Les CML sont des cellules mononucléées fusiformes, localisées dans la média des artères et des veines [8]. Les CML peuvent présenter deux phénotypes : contractile ou sécrétoire [8,35–37]. Dans les artères saines, leur phénotype est majoritairement contractile, permettant de contrôler le maintien du tonus vasculaire, la distribution du flux sanguin et la pression sanguine en réponse à divers médiateurs d'origine locale (NO), nerveuse (acétylcholine) ou hormonale (angiotensine II) [8,35,37].

Lors d'une lésion vasculaire, elles peuvent acquérir un phénotype sécrétoire, et ainsi produire les composants de la MEC dont des collagènes, de l'élastine, de la fibronectine et des protéoglycanes [8,35–37]. De même, elles acquièrent des propriétés procoagulantes en sécrétant du FT à leur surface [38]. Leur stimulation entraîne également leur migration et prolifération, ce qui peut, en situation pathologique, contribuer au développement des plaques d'athérosclérose [37,39].

1.3. Les fibroblastes

Les fibroblastes, localisés dans l'adventice, sont des cellules fusiformes ou étoilées, dotées de longs prolongements cytoplasmiques [8,40]. Ce sont les principaux producteurs de la MEC de l'adventice par la synthèse notamment des collagènes, de l'élastine et de la fibronectine [8,40]. Les fibroblastes ont également un rôle majeur dans la réparation tissulaire

du fait de leur capacité à dégrader les tissus endommagés et à régénérer les composants de la matrice [40,41].

Tout comme les CML, les fibroblastes possèdent, après activation, des propriétés procoagulantes en sécrétant du FT à leur surface [38,39]. Une stimulation entraîne leur migration, leur prolifération et la formation de tissu conjonctif ce qui contribue au développement des plaques d'athérosclérose par la formation d'une néo-intima [8,41,42].

2. La matrice extracellulaire

La MEC est une structure tridimensionnelle non cellulaire, présente dans tous les tissus. Elle consiste en un réseau composé d'une large variété de protéines, regroupées en trois principales classes de macromolécules : les protéoglycanes, les collagènes et les glycoprotéines [43,44]. Les collagènes sont les protéines principales de la MEC, mais l'on retrouve également de l'élastine, de la fibronectine, du FW, du fibrinogène et des laminines [43–45]. On distingue dans la MEC deux structures : la matrice interstitielle, située entre les cellules et qui fournit une structure pour les tissus, et la lame basale, structure plus spécialisée et plus organisée sur laquelle reposent les CE [43–45].

La MEC joue un rôle passif important de soutien de la paroi vasculaire en servant d'ancrage aux cellules pour former les tissus. Elle a également un rôle actif dans la régulation des fonctions des CE, des CML et des fibroblastes, en participant à la régulation de nombreux processus, dont la transmission de signaux de prolifération, de migration, de survie et de différenciation [43–45]. La MEC est responsable de la réponse thrombogène en cas d'une lésion l'exposant, ce qui induit l'adhérence et l'activation plaquettaire [19]. La composition de la MEC varie en fonction du territoire vasculaire et change au cours du vieillissement et des pathologies, comme dans le cas de l'athérosclérose [45,46].

2.1. La lame basale

La lame basale, sur laquelle repose l'endothélium, est une structure spécialisée de la MEC de 50 à 100 nanomètres d'épaisseur, composée principalement de collagène de type IV, de laminines, de nidogène et de perlecan. On y retrouve également du collagène de type VIII,

XV et XVIII selon la localisation de cette structure [47–50]. Le réseau de laminines permet l'adhérence des CE à leur pôle basal et le réseau de collagène de type IV sous-jacent permet de la stabiliser [49–52].

La lame basale forme une barrière semi-perméable grâce à sa composition en collagènes et sa densité en protéines [48]. Elle participe à l'angiogenèse en régulant la prolifération, la migration et la différenciation des CE. Elle est également importante dans le maintien de l'intégrité vasculaire [50,53,54].

2.2. Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de la MEC [55,56]. Vingt-huit types différents de collagènes sont retrouvés chez les vertébrés [55,57,58]. Ils sont synthétisés par les CE, les CML et les fibroblastes et sont formés de chaînes polypeptidiques α enroulées en hélices gauches sur lesquelles on trouve des répétitions du motif glycine – proline – hydroxyproline (GPO) [55,58–61]. L'association de trois hélices gauches forme une triple hélice droite, précurseur soluble du collagène, appelée procollagène [62]. Les extrémités C- et N-terminales du procollagène sont ensuite clivées par protéolyse ce qui permet de former le tropocollagène, s'organisant en polymère de collagène insoluble [62] (**Figure 2**).

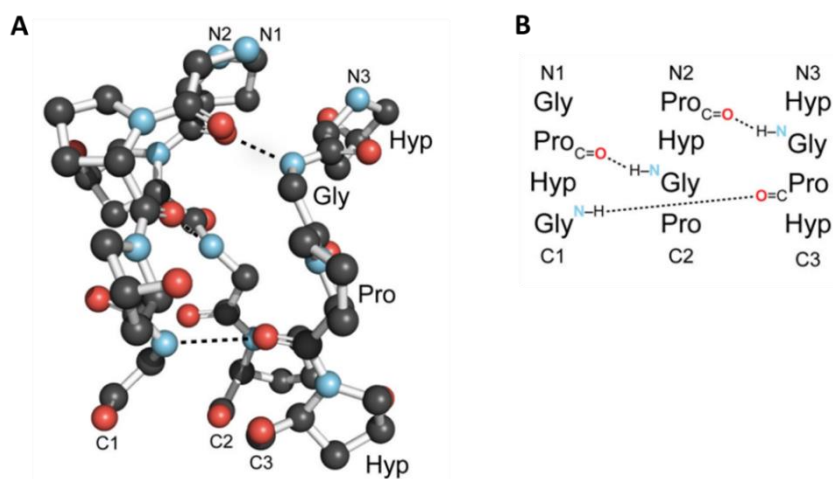


Figure 2 : Structure de la triple hélice du collagène

(A) Schéma d'un segment de la triple hélice du collagène, mettant en évidence l'intrication des liaisons hydrogène (liaisons grisées) entre les trois hélices. (B) Dépliement des trois hélices et des liaisons entre elles. Gly : glycine ; Hyp : hydroxyproline ; Pro : proline. D'après Shoulders & Raines, 2009 [63].

Les collagènes sont répartis en différents groupes dont treize ont été décrits au niveau vasculaire [62,64]. Les collagènes fibrillaires de type I et III sont les composants majeurs de la média et de l'adventice, où l'on retrouve également du collagène V [58,64]. Les collagènes formant des réseaux comprennent le type IV, constituant majeur de la membrane basale, et le type VIII, surtout présent dans le sous-endothélium [19,59,62]. Les autres collagènes retrouvés dans les vaisseaux peuvent former des microfibrilles comme le type VI et VII ou être associés aux fibrilles telles que les types XII, XIV, XV, XVI, XVIII et XIX [55–57,62,63,65].

Les collagènes jouent un rôle structural puisqu'ils sont responsables de la résistance et de l'élasticité du vaisseau [58,65]. Ils concourent également à l'hémostase lors de leur exposition à la suite d'une lésion vasculaire, en permettant l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes pour former un clou hémostatique [19,56,57,61,66]. Ce processus implique principalement deux récepteurs plaquettaires : i) l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, par la séquence glycine – phénylalanine – pyrrolisine – glycine - acide glutamique – arginine (GFOGER, séquence de six acides aminés spécifiques des collagènes) et ii) la GPVI qui lie le motif GPO [19,56,57,61,66,67].

L'importance du collagène dans l'organisation ou la structure des vaisseaux est mise en évidence par le syndrome d'Ehlers-Danlos, caractérisé par une anomalie d'élasticité vasculaire entraînant la formation d'anévrismes [58,65].

2.3. Le facteur Willebrand

Le FW est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les mégacaryocytes et les CE. Il est stocké dans les corps de Weibel-Palade des CE et dans les granules α des mégacaryocytes et plaquettes d'où il est sécrété après activation des cellules [47,68–70]. Les corps de Weibel-Palade libèrent du FW de manière continue dans le sang, où il se retrouve sous forme de multimères allant de 500 à 20 000 kDa et à une concentration de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les CE sécrètent également du FW de haut poids moléculaire dans le sous-endothélium [47,68,70–73]. La nature multimérique du FW est un déterminant important de sa réactivité.

Chaque monomère de FW est composé de plusieurs domaines fonctionnels : i) le domaine A1 qui lie la GPIIb α des plaquettes et le collagène de type VI, ii) le domaine A2, site de clivage du FW par l'ADAMTS13 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin*

type 1 repeat 13), permettant de réguler la taille des multimères circulants, iii) le domaine A3, site de liaison du collagène sous-endothélial de type I et III, iv) le domaine C1 présentant une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui lie l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et v) le domaine D3, site de liaison du facteur de coagulation VIII [47,70–72,74,75] (**Figure 3**).

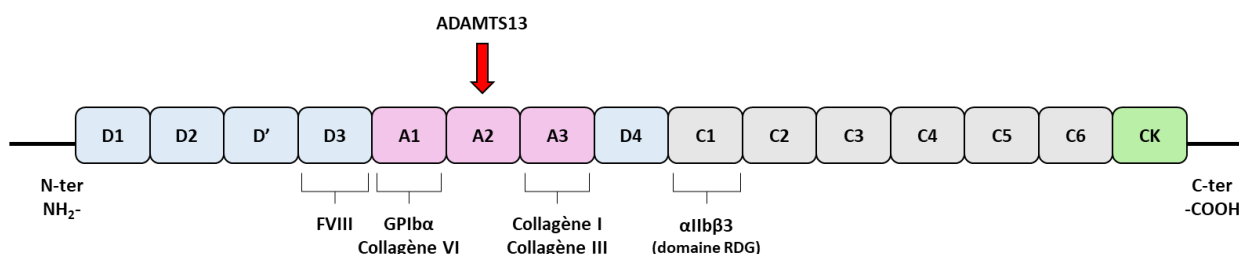


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du monomère de FW

ADAMTS-13 : *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeat-13* ; RGD : séquence arginine-glycine-acide aspartique. D'après Brehm, 2017 [72].

Le FW plasmatique se présente sous une conformation globulaire peu favorable à la liaison de la GPIIb [74,76,77]. Suite à une lésion vasculaire, le FW plasmatique s'adsorbe sur des protéines adhésives sous-endothéliales, notamment le collagène, la fibronectine et les laminines [47,66,74,78]. Une fois le FW immobilisé, les forces de cisaillements permettent son extension et l'exposition de son domaine A1, assurant l'attachement des plaquettes au site de lésion vasculaire par son interaction avec la GPIIb [47,74,76,79]. Le FW peut également contribuer à l'adhérence des plaquettes en interagissant avec l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ plaquettaire, mais cette interaction est très peu efficace et peu importante [47,74]. En plus d'assurer l'étape initiale d'attachement des plaquettes en conditions de flux élevés, le FW contribue également à la croissance des thrombi puisqu'il assure l'adhérence de plaquettes circulantes à un agrégat en cours de formation [66,80,81].

Chez l'Homme, le FW occupe une place importante dans l'hémostase. Ceci est mis en évidence par la maladie de Willebrand, syndrome hémorragique dû à un déficit quantitatif ou qualitatif du FW, et aussi par le purpura thrombotique thrombopénique (PTT), résultant d'un défaut de l'ADAMTS13 [47,70,72,76,79]. Dans ce dernier, les multimères de haut poids moléculaire de FW ne sont plus clivés et s'accumulent dans le plasma, causant la formation de microthrombi, ce qui résulte en une thrombopénie [47,79,82].

2.4. Le fibrinogène

Le fibrinogène, facteur I de la coagulation, est une glycoprotéine hexamérique soluble plasmatique. Il est synthétisé par les hépatocytes puis libéré dans le plasma, où il circule à la concentration de 2 à 4 g/L [12,83,84]. Il est également stocké dans les granules α plaquettaires [12,85]. Au niveau structurel, le fibrinogène est composé de trois chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ), assemblées en un homodimère par des ponts disulfures entre leur domaine N-terminal puis en complexes hexamériques ($A\alpha$ - $B\beta$ - γ)₂ liés par des ponts disulfures [12,84,86–88]. Chaque monomère de fibrinogène possède trois sites de liaison pour l'intégrine α IIb β 3 : deux séquences RGD, situées sur la chaîne $A\alpha$, et le dodécapeptide de l'extrémité C-terminale de la chaîne γ [89,90] (**Figure 4**).

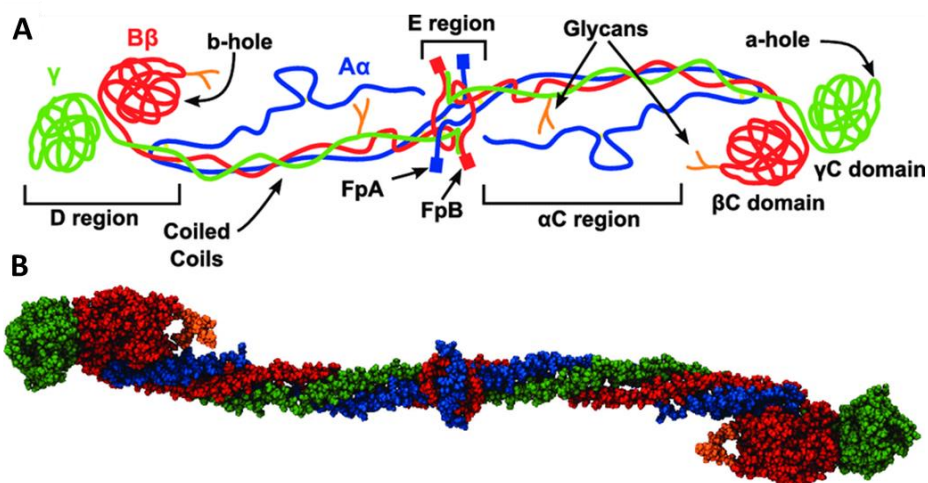


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du fibrinogène

FpA : fibrinopeptide A ; FpB; fibrinopeptide B. D'après Köhler, Smid & Settanni, 2015 [91].

Le fibrinogène joue un rôle-clé dans l'agrégation plaquettaire en formant un pont entre les intégrines α IIb β 3 activées, permettant ainsi de lier les plaquettes entre elles et de créer le clou hémostatique. Le fibrinogène est également le principal substrat de la thrombine issue de la cascade de la coagulation, dont l'action protéolytique permet de le transformer en fibrine insoluble et ainsi stabiliser l'agrégat plaquettaire [83,88,92].

L'importance du fibrinogène est confirmée par l'existence de syndromes hémorragiques associés à des défauts qualitatifs ou quantitatifs de ce dernier, tels que la dysfibrinogénémie et l'afibrinogénémie, caractérisées respectivement par un fibrinogène circulant non fonctionnel et une absence totale de fibrinogène circulant [83,93].

2.5. La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine de 250 kDa, exprimée dans de nombreux tissus [94]. Elle joue un rôle structural, mais également de régulation pour les cellules ancrées dans la MEC [95]. Elle se compose de monomères comprenant trois domaines répétés majeurs (FNI, FNII et FNIII) ainsi qu'une région variable V [94–96] (**Figure 5**). Les monomères s'assemblent en dimères par des ponts disulfures, qui peuvent s'associer pour former des multimères [97,98]. Il existe deux formes de fibronectine : la fibronectine plasmatique, sécrétée dans le sang par les hépatocytes, et la fibronectine cellulaire synthétisée par différents types cellulaires, dont les fibroblastes, les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. Elle est présente dans les granules α plaquettaires et la paroi vasculaire [94,95,99]. La fibronectine plasmatique est soluble tandis que la forme cellulaire est assemblée en fibrilles insolubles dans les différentes couches de la paroi vasculaire [94,99].

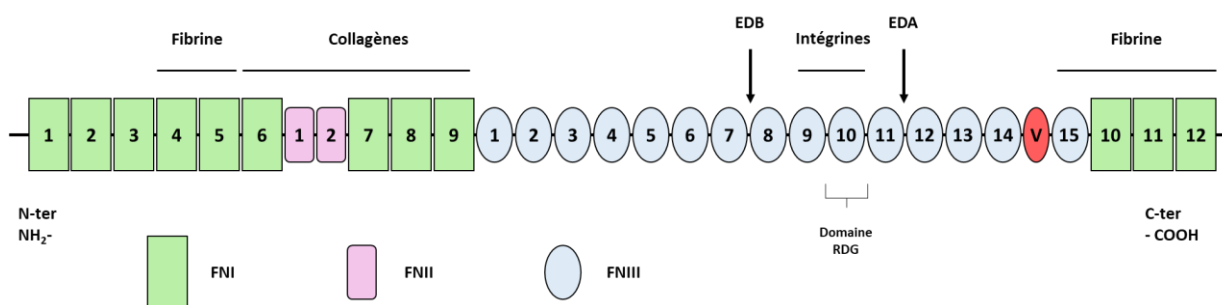


Figure 5 : Représentation schématique de la structure de la fibronectine

EDA : extra-domaine A ; EDB : extra-domaine B ; FNI : domaine de type I ; FNII : domaine de type II ; FNIII : domaine de type III ; V : région variable ; RDG : région aginine-glycine-acide aspartique. D'après To & Midwood, 2011 [95].

La fibronectine permet l'assemblage et l'organisation de la MEC en y incorporant les collagènes I et III et le fibrinogène [95,97,100]. Plus récemment, il a été montré que la fibronectine est aussi impliquée dans l'athérosclérose et dans la thrombo-inflammation, une interaction entre les plaquettes et le système inflammatoire lors de l'ischémie / reperfusion au niveau cérébral et cardiaque [101–103].

La fibronectine contribue à l'adhérence et l'activation des plaquettes en condition de flux [78,94]. En effet, les intégrines plaquettaires $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha IIb\beta 3$ interagissent avec la séquence RGD de la fibronectine [78,94,95,97,104]. La fibronectine régule également la stabilité et la croissance des thrombi puisque son absence retarde la formation d'un thrombus occlusif [94,96,104].

II. L'hémostase

L'hémostase est un processus physiologique permettant le maintien de l'intégrité vasculaire et l'arrêt du saignement à la suite d'une lésion vasculaire. Elle se découpe en trois phases : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. L'hémostase primaire est assurée par l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes au niveau du site de lésion. La coagulation consiste en une cascade de réactions enzymatiques, initiée par le facteur tissulaire et conduisant à la génération de thrombine (facteur IIa de la coagulation). Cette dernière transforme alors le fibrinogène soluble en un réseau de fibrine insoluble qui consolide l'agrégat plaquettaire [105,106]. À la fin des deux premières étapes, concomitantes, la fibrinolyse est initiée et génère localement de la plasmine qui dégrade la fibrine pour dissoudre le caillot et permettre de rétablir un flux sanguin normal [105,106].

A. L'hémostase primaire et la plaquette sanguine

Dans leur livre *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*, Bernard Boneu et Jean-Pierre Cazenave ont décrit l'hémostase primaire comme étant un processus physiologique essentiel au maintien de l'homéostasie ainsi que la première étape du processus de réparation tissulaire. L'hémostase primaire repose sur la capacité des plaquettes à former un clou hémostatique au site de lésion vasculaire afin de limiter le saignement [12].

1. Définition et structure de la plaquette

Les plaquettes sont des petites cellules anucléées dérivées du cytoplasme des mégacaryocytes de la moelle osseuse [105–107]. Les plaquettes humaines ont un diamètre de 3 μm pour une épaisseur de 1 μm [107]. Après s'être détachées des mégacaryocytes, elles circulent dans le sang sous forme discoïde pendant 7 à 10 jours, à une concentration de 150 000 à 400 000 plaquettes par microlitre, puis sont éliminées par les macrophages de la rate et du foie [105,108].

Les plaquettes sont composées d'une membrane plasmique, d'un cytoplasme, d'un cytosquelette et d'organites (**Figure 6**). La membrane plasmique consiste en une bicouche asymétrique associant phospholipides, cholestérol, glycolipides, protéoglycanes et glycoprotéines [109]. Elle présente des invaginations, appelées système canaliculaire ouvert, permettant d'augmenter la surface d'échange entre la plaquette et le milieu extérieur, mais également de constituer une réserve de membrane pour le changement de forme qui survient lors de l'activation plaquettaire [110].

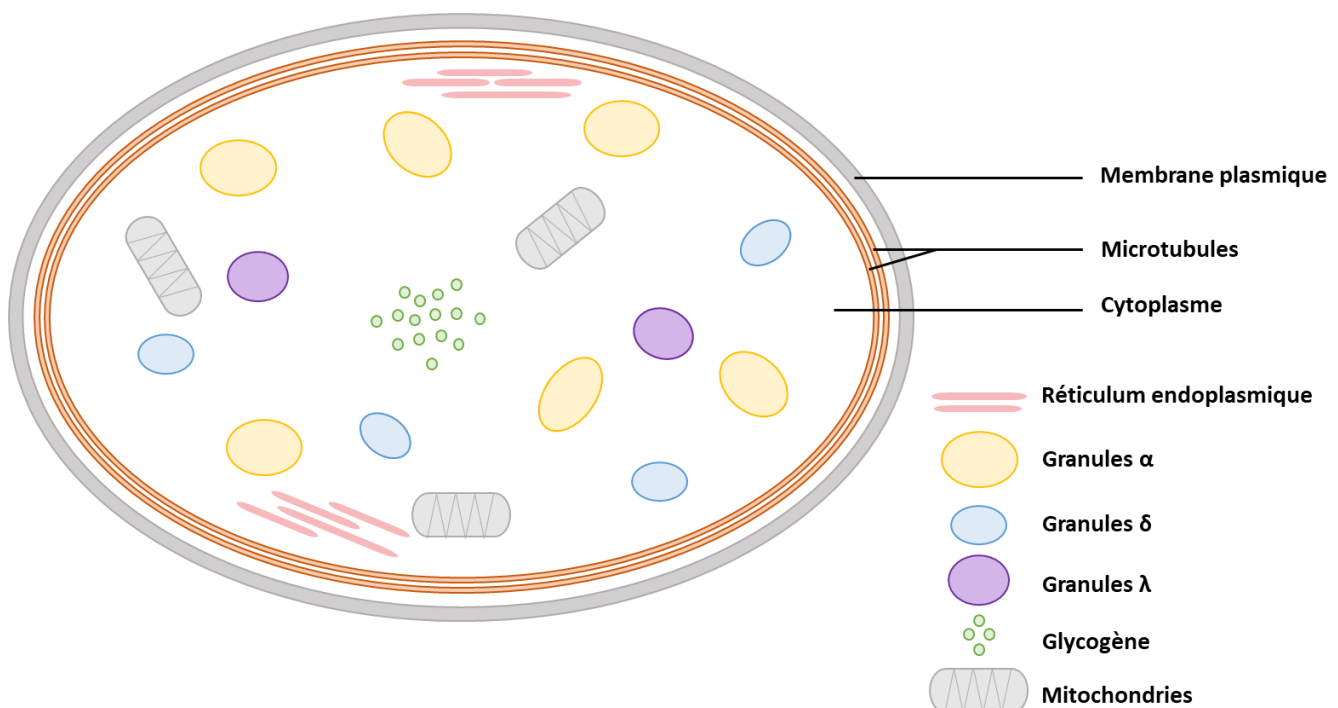


Figure 6 : Schéma représentatif de la composition d'une plaquette humaine

Le cytosquelette plaquettaire est composé de microtubules formant un réseau circonférentiel et de filaments d'actomyosine [107,109–111]. Il est responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos, mais également de leur changement de forme lors de leur activation. Ce phénomène est régulé par une dépolymérisation et une repolymérisation rapides des filaments d'actine [107].

Les plaquettes possèdent également divers organites : des mitochondries, un réticulum endoplasmique, des grains de glycogène et des granules. Elles contiennent trois types de granules : des granules α , des granules denses δ et des lysosomes λ [109,112]. Les granules α

sont les plus abondants. On en retrouve 50 à 80 par plaquette humaine, d'un diamètre de 200 à 500 nm [109,112]. Ils contiennent principalement des glycoprotéines adhésives (fibrinogène, FW), des facteurs de la coagulation (facteurs V, XI, XIII, FT), des facteurs de croissance (VEGF) ainsi que de la P-sélectine. Les granules denses δ sont moins nombreux et plus petits que les granules α . On en dénombre 3 à 8 par plaquette, d'un diamètre de 150 nm [109,112]. Ils contiennent entre autres de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine et du calcium. Enfin, on trouve entre 0 et 3 lysosomes par plaquette, d'un diamètre de 200 à 250 nm. Ils contiennent diverses protéases qui possèdent des fonctions extracellulaires importantes, telles que le clivage des récepteurs, la fibrinolyse et la dégradation des composants de la MEC [112]. Le rôle des granules dans l'hémostase est mis en évidence par des troubles hémorragiques divers, tels que le syndrome des plaquettes grises, un trouble hémorragique grave lors de l'absence de granules α , et le syndrome de Hermansky-Pudlak chez les patients présentant un déficit héréditaire en granules denses.

2. Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire

Les mécanismes moléculaires de l'hémostase primaire sont à présent largement connus. À la suite d'une lésion vasculaire, les protéines du sous-endothélium sont exposées au flux sanguin. Le FW circulant se lie au collagène sous-endothélial par son domaine A3 et recrute des plaquettes par l'interaction entre son domaine A1 et la GPIb α du complexe GPIb-IX-V [47,74,113]. L'adhérence stable des plaquettes est alors assurée par l'interaction des intégrines de la famille β 1, α 2 β 1, α 5 β 1 et α 6 β 1, qui se lient à leurs ligands plaquettaires respectifs, à savoir le collagène, la fibronectine et les laminines [47,113]. L'intégrine α IIb β 3 est également impliquée dans l'adhérence stable des plaquettes par sa liaison au FW et à la fibronectine du sous-endothélium [74,114]. Cette adhérence stable permet l'interaction entre le collagène sous-endothélial et la GPVI plaquettaire, ce qui déclenche une cascade de signalisation intracellulaire, activant les plaquettes [47,113,115]. Les plaquettes changent alors de forme, se contractent, émettent des filopodes et libèrent le contenu des granules plaquettaires comprenant notamment l'ADP et l'ATP, mais synthétisent et libèrent également du TxA2 [115]. Ces agonistes solubles amplifient, via leurs récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂ pour l'ADP, P2X₁ pour l'ATP et le récepteur du thromboxane (TP) pour le TxA2, l'activation plaquettaire en

augmentant l'affinité de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ pour son principal ligand, le fibrinogène soluble, qui assure l'agrégation et la formation du bouchon hémostatique [113] (**Figure 7**).

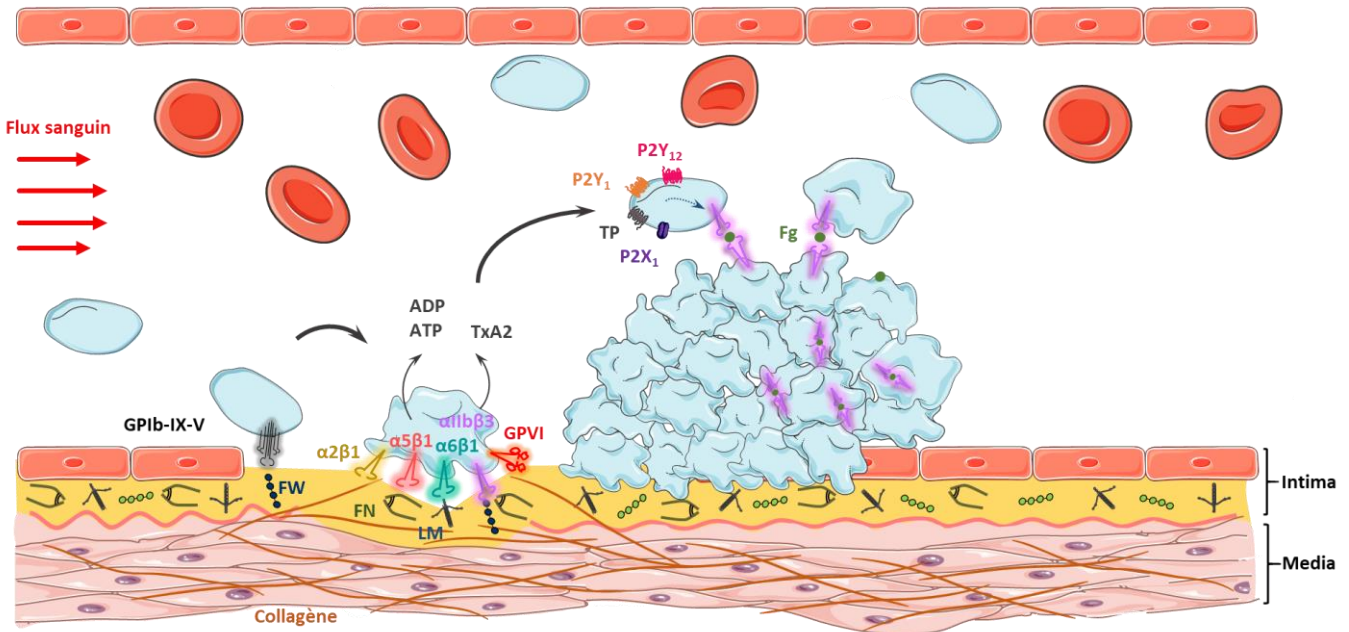


Figure 7 : Les mécanismes moléculaires de l'hémostasie primaire

ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; Fg : fibrinogène ; FN : fibronectine ; FW : facteur de Willebrand ; GP : glycoprotéine; LM : laminines ; TxA2 : thromboxane A2.

3. Les récepteurs plaquettaires

L'hémostasie primaire est médiée par de nombreux récepteurs permettant l'adhérence, l'activation et l'agrégation plaquettaire. On distingue deux types de récepteurs : les récepteurs d'adhérence et d'activation qui ont une signalisation basée sur les tyrosines kinases et les récepteurs aux agonistes solubles dont la majorité est couplée aux protéines G.

3.1. Les récepteurs d'adhérence et d'activation

3.1.1. Le complexe GPIb-IX-V

Le complexe GPIb-IX-V est uniquement exprimé à la surface des mégacaryocytes et des plaquettes. Il appartient à la superfamille des protéines riches en leucine, caractérisée par la

présence d'un ou plusieurs domaines de "répétitions riches en leucine" [116–118]. Le complexe GPIb-IX-V contient quatre sous-unités différentes : une sous-unité GPIb α liée à deux sous-unités GPIb β *via* des ponts disulfures pour former la GPIb ; cette dernière est associée à une sous-unité GPIX pour former le complexe GPIb-IX puis à une sous-unité GPV [118–120]. On dénombre environ 25 000 copies de GPIb-IX et 12 500 copies de GPV par plaquette [116,118,121]. La GPIb α est la sous-unité majeure puisque c'est elle qui interagit avec la majorité des ligands du complexe par son domaine N-terminal extracellulaire [122,123] (**Figure 8**).

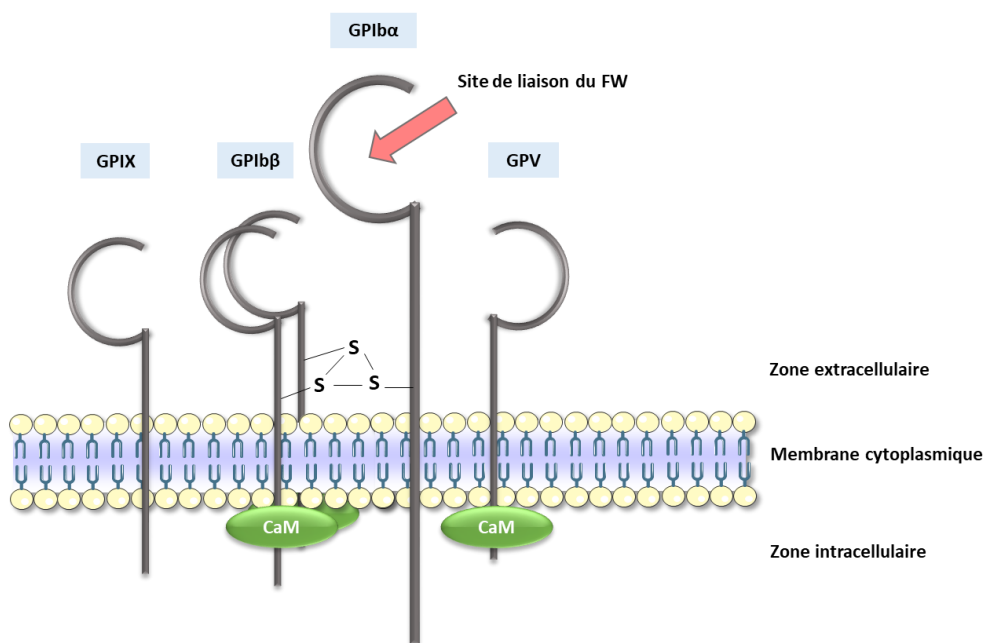


Figure 8 : Structure du complexe GPIb-IX-V

CaM : calmoduline ; FW : facteur de Willebrand ; GP : glycoprotéine ; S : pont disulfure.

Le principal ligand du complexe GPIb-IX-V est le domaine A1 du FW qui joue un rôle déterminant dans le recrutement des plaquettes à taux de cisaillement élevé ($> 1\,000\text{ s}^{-1}$), que l'on retrouve au niveau d'une lésion vasculaire [74,122]. La GPIb α se lie également à d'autres ligands, dont la thrombine, la P-sélectine, la thrombospondine-1 (TSP-1), le facteur XI et le facteur XII [116,117,122–125].

La liaison du FW à la GPIb α induit une cascade de signalisation intracellulaire de très faible intensité impliquant des membres de la famille Src-kinase, ce qui conduit à l'activation

de la phospholipase (PL) C γ 2 et à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium (Ca²⁺). Cette signalisation permet l'activation des plaquettes et leur changement de forme [121,126,127].

Le complexe GPIb-IX joue un rôle crucial dans l'hémostase, ce qui est mis en évidence par le syndrome de Bernard-Soulier, un trouble hémorragique rare caractérisé par une macrothrombopénie, qui survient lorsqu'un des membres du complexe GPIb-IX est défectueux [118,128,129]. D'autre part, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'absence du complexe GPIb-IX ou le blocage de l'interaction FW-GPIb réduit la thrombose expérimentale, indiquant l'importance de ce complexe dans la thrombose artérielle [121,123,130,131].

3.1.2. La GPVI

La GPVI est une glycoprotéine d'environ 65 kDa exprimée uniquement sur les mégacaryocytes et les plaquettes [115,132]. Il existe 3 000 à 5 000 copies de GPVI par plaquette [115,133]. La GPVI est principalement exprimée sous forme monomérique sur les plaquettes au repos, mais environ 30 % est exprimée sous forme dimérique, une proportion qui augmente lors de l'activation des plaquettes et qui présente plus d'affinité pour les ligands de la GPVI [134,135].

La GPVI appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig), car elle possède deux domaines Ig extracellulaires (D1 et D2) liés par des ponts disulfures, auxquels se lient ses ligands [115,134]. Elle contient également une tige mucine riche en sérine et thréonine avec des sites de O-glycosylation, une courte région transmembranaire et une extrémité intracytoplasmique [115,132,136]. Cette région lie la calmoduline et contient un domaine riche en proline (DRP) interagissant avec les kinases de la famille Src, Lyn et Fyn [115,132] (**Figure 9**).

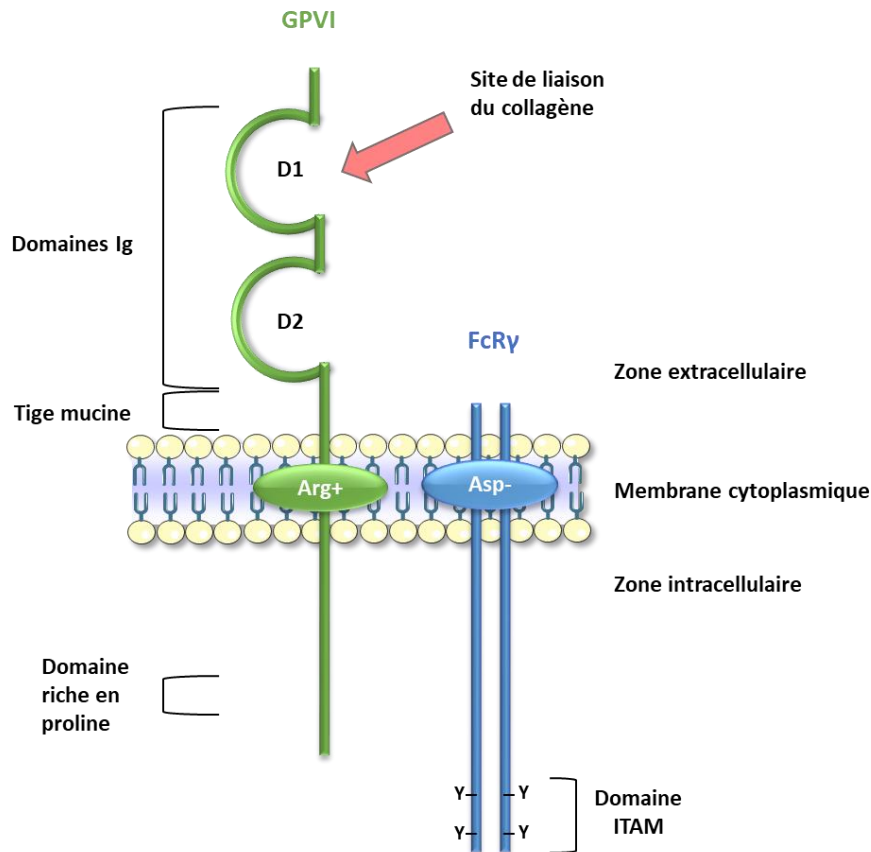


Figure 9 : Structure de la GPVI

Arg : arginine ; Asp : aspartate ; FcR γ : partie Fc des récepteurs γ ; GP : glycoprotéine ; Ig : immunoglobuline ; ITAM : motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine ; Y : tyrosine.

La GPVI est connue pour être le principal récepteur d'activation des plaquettes aux collagènes fibrillaires [115,137,138]. Les séquences GPO des collagènes de type I et III jouent un rôle déterminant dans la liaison de la GPVI [132,134,139]. Cependant, d'autres ligands ont également été identifiés, notamment la fibronectine, le fibrinogène, la fibrine et les laminines [115,135,137,140,141].

La GPVI est associée à la chaîne γ des récepteurs Fc (FcR γ) *via* un pont salin entre une arginine sur la GPVI et un aspartate sur FcR γ . Cette dernière est essentielle pour l'expression de la GPVI à la surface plaquettaire et contient également un domaine de signalisation ITAM (*immunoreceptors tyrosine-based activation motif*) [84,142–145]. Ce dernier initie une cascade de signalisation à la suite de l'interaction de la GPVI avec ses ligands [132,145,146].

La liaison du collagène à la GPVI favorise son regroupement en multimères et rapproche les kinases de la famille Src, Fyn et Lyn, liées au domaine intracytoplasmique de la GPVI du domaine ITAM de la chaîne FcR γ , favorisant sa phosphorylation [115,143,147–150]. Cela conduit au recrutement et à la phosphorylation de la tyrosine kinase Syk qui initie une cascade de signalisation, conduisant à la formation d'un complexe de signalisation basé sur LAT (*Linker for activation of T cells*) située au niveau de la membrane plaquettaire [151]. LAT phosphorylé lie entre autres la phospholipase (PL) C γ 2, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la protéine kinase de Bruton (Btk) formant ainsi le complexe de signalisation LAT [148,149]. Ce complexe hydrolyse le phospho-inositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), ce qui entraîne la libération de Ca²⁺ des réserves internes dans le cytosol et permet la libération des agonistes solubles, qui amplifient l'activation plaquettaire [148,152] (Figure 10).

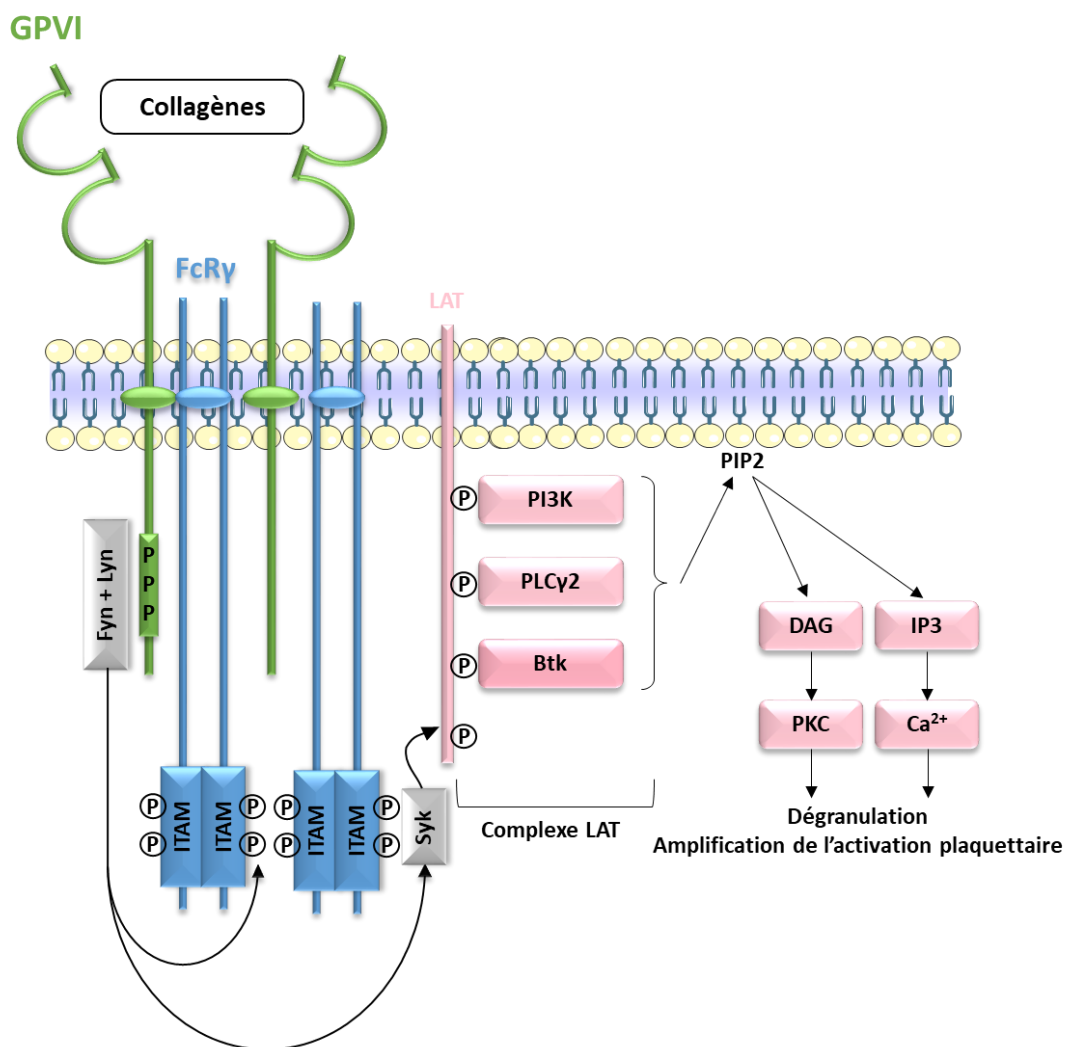


Figure 10 : Voie de signalisation de la GPVI

Btk : protéine kinase de Bruton ; Ca^{2+} : calcium ; DAG : diacylglycérol ; GP : glycoprotéine ; IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate ; ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ; LAT : *linker for activation of T cells* ; P : phosphorylation ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PIP2 : phospho-inositol-4,5-bisphosphate ; PKC : protéine kinase C ; PLC γ 2 : phospholipase γ 2. Adapté de Watson *et al*, 2005 et Rayes, 2019 [148,153].

La GPVI n'est pas un récepteur clé pour l'hémostase puisque les patients présentant un défaut ou une absence de GPVI n'ont pas de saignements majeurs [152,154,155]. Ceci est confirmé sur des souris déficientes ou immunodéplétées en GPVI par l'anticorps JAQ1 qui ne présentent pas de prolongation du temps de saignement à la queue [150,156–158]. Par ailleurs, il a été mis en évidence un rôle important de la GPVI dans différents modèles de thrombose murins, notamment dans un modèle d'athéromatose chez des souris déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) et pour lesquelles des plaques d'athérosclérose dans la carotide ont été rompues [130,159–164]. Ceci suggère que la GPVI représente une cible antithrombotique avec potentiellement un effet mineur sur les saignements.

3.1.3. Les intégrines

Les intégrines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires qui servent à la fois de molécules d'adhérence cellulaire et de signalisation. Ce sont des hétérodimères composés de sous-unités α et β associées de manière non covalente. Chaque sous-unité est constituée de trois domaines : un grand domaine extracellulaire responsable de la liaison au ligand, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique plus petite [165–168]. Les intégrines régulent de nombreuses fonctions biologiques (migration, prolifération, différenciation et apoptose cellulaire), mais également pathologiques (cancer, saignement, maladie inflammatoire, thrombose) [167–169].

Chez les mammifères, vingt-quatre intégrines ont été décrites. Elles consistent en l'association de dix-huit chaînes α avec huit sous-unités β [165–167,170,171]. Cinq intégrines, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha \text{IIb}\beta 3$, sont présentes sur les plaquettes humaines, divisées en deux sous-groupes : les $\beta 1$ et $\beta 3$ [167,171].

Les intégrines peuvent adopter trois états conformationnels différents. Sur les plaquettes au repos, les intégrines sont généralement inactives et présentent une faible affinité pour les ligands extracellulaires. L'ectodomaine de l'intégrine est replié en formant un V inversé avec une faible affinité pour ses ligands. L'activation des plaquettes génère un signal *inside-out*, ce qui conduit les intégrines à passer à un état intermédiaire dans lequel la molécule s'étend. Dans cette conformation, les intégrines ont une affinité modeste pour leurs ligands. En cas de signal plus intense, les intégrines adoptent une conformation ouverte, conférant une affinité élevée pour les ligands [166–168,170,172].

3.1.3.1. $\alpha 2\beta 1$

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est exprimée à la surface des plaquettes, des fibroblastes, des cellules épithéliales et endothéliales [173–175]. On en retrouve entre 3 000 et 5 000 copies par plaquette [171,176]. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ a été le premier récepteur au collagène identifié sur les plaquettes et assure principalement l'adhérence stable [177,178]. Elle reconnaît le collagène fibrillaire de type I avec une grande affinité, mais peut également lier le collagène sous-endothélial de type II, III et IV [174,179,180]. Elle lie également d'autres ligands, tels que les laminines, les perlecans et les protéoglycanes [174,175,181]. La voie de signalisation *outside-in* de ce récepteur entraîne un changement de forme, une extension des filopodes, la formation de lamellipodes et l'étalement des plaquettes [182].

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne semble pas jouer un rôle critique dans l'hémostase. En effet, deux patients présentant un défaut génétique de cette intégrine n'ont présenté qu'un phénotype hémorragique modéré [183,184]. Ce résultat est retrouvé chez des souris ayant un déficit de la chaîne $\alpha 2$ et qui présentent un temps de saignement de la queue normal [138,174,175,182,185]. En revanche, son rôle dans la formation et la stabilité des thrombi a été démontré en thrombose expérimentale dans des modèles murins déficients pour l' $\alpha 2$ [84,182,186].

3.1.3.2. $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est exprimée à la surface des plaquettes, des CE, des fibroblastes, des lymphocytes, des monocytes et des cellules cancéreuses [171,187]. On en dénombre entre 2

000 et 4 000 copies par plaquette [188]. Le principal ligand de l' $\alpha 5\beta 1$ est un composant de la MEC, la fibronectine, mais il interagit également avec d'autres protéines présentant une séquence arginine – glycine – asparagine (RGD) [171,187–189]. La liaison de l' $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine favorise l'adhérence des plaquettes, ce qui entraîne une signalisation *outside-in* menant au changement de forme des plaquettes et à la formation de filopodes [190,191].

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans la migration et la différenciation cellulaire, c'est pourquoi son absence entraîne une létalité embryonnaire par manque de développement des vaisseaux sanguins [188,192,193]. Pour cette raison, l'étude de son rôle dans la formation de thrombi *in vivo* a débuté récemment, notamment au laboratoire où nous avons généré une souris pour laquelle le gène $\alpha 5$ a été supprimé spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. L'étude de cette souris confirme le rôle clé d' $\alpha 5\beta 1$ comme un récepteur de la fibronectine et indique qu' $\alpha 5\beta 1$ ne joue pas un rôle majeur en hémostase et en thrombose expérimentale [194].

3.1.3.3. $\alpha 6\beta 1$

L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est exprimée à la surface des plaquettes, des leucocytes, des CE vasculaires, des CML et de nombreuses cellules épithéliales [195,196]. On en compte entre 4 000 et 12 000 copies par plaquette [188,197]. Les principaux ligands de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ sont les laminines, mais il a également été montré une interaction directe entre l' $\alpha 6\beta 1$ et la TSP-1 dans la microvascularisation [196,197]. La liaison de l'intégrine à ses ligands favorise l'adhérence des plaquettes et promeut la signalisation *outside-in* qui entraîne une augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} , un changement de forme et l'extension des filopodes [197–199].

L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ ne semble pas jouer un rôle critique dans l'hémostase, car le temps de saignement chez les souris déficientes en $\alpha 6$ n'est pas augmenté [197]. En revanche, elle joue un rôle important dans la thrombose artérielle dans des modèles murins puisque ces souris présentent une réduction du thrombus formé dans trois modèles de thrombose expérimentale [197].

3.1.3.4. $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est un hétérodimère composé d'une sous-unité αIIb et d'une sous-unité β3 , spécifiquement exprimée dans la lignée mégacaryocytaire [188,200–203]. On dénombre environ 80 000 copies à la surface d'une plaquette au repos et 30 000 copies supplémentaires se trouvent sur la membrane du système canaliculaire ouvert et des granules α . Ces dernières sont exposées à la surface des plaquettes après activation [84,171,204,205]. Le fibrinogène est le principal ligand de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ce récepteur reconnaît à la fois la séquence RGD de la chaîne α et la séquence KQAGDV de la chaîne γ du fibrinogène [84]. Cette interaction permet le pontage de plaquettes adjacentes entraînant leur agrégation, ce qui représente la fonction principale de l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [206–208]. Elle reconnaît également d'autres protéines adhésives possédant un motif RGD, notamment le FW, la fibronectine et la vitronectine [84,171,207,208]. Son interaction avec le FW et la fibronectine est impliquée dans l'adhérence stable des plaquettes et pourrait également participer à la formation d'agrégats à faible taux de cisaillement ($< 1\ 000\ \text{s}^{-1}$) [114,191,200,209,210]. Après la liaison du ligand, la voie de signalisation *outside-in* de ce récepteur entraîne un changement de forme des plaquettes, favorise la sécrétion du contenu des granules et la rétraction du caillot de fibrine [114,167,171,211].

Un défaut ou une déficience d'une sous-unité de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ entraîne un trouble hémorragique rare et grave, la thrombasthénie de Glanzmann, qui se caractérise par une diminution de la capacité des plaquettes à adhérer, à s'étaler et à agréger, malgré une numération plaquettaire normale [167,171,200]. De même, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ joue un rôle crucial dans la thrombose artérielle par sa capacité à assurer l'agrégation plaquettaire et donc la croissance et la stabilité du thrombus, comme montré dans des modèles murins déficients en intégrine β3 [167,171,188,208,212]. Son inhibition permet ainsi de prévenir la croissance du thrombus dans différents modèles expérimentaux [171,191,197]. L'utilisation clinique d'agents antiplaquettaires ciblant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, tels que l'abciximab, un fragment Fab d'un anticorps monoclonal chimérique, l'eptifibatide, un heptapeptide cyclique, et le tirofiban, un composé de synthèse dérivé de la tyrosine, atteste de son importance dans la thrombose artérielle. L'utilisation de cette classe de médicaments est limitée aux situations aiguës, en raison d'un risque hémorragique important.

3.2. Les récepteurs aux agonistes solubles

L'ADP, l'ATP, la thrombine et le TxA2 sont des agonistes solubles indispensables pour l'amplification de l'activation plaquettaire et la croissance et la stabilité du thrombus. Ils se fixent sur leurs récepteurs respectifs, à savoir des récepteurs canaux ioniques (P2X₁) ou des récepteurs couplés aux protéines G (P2Y₁, P2Y₁₂, TP et PAR) [213].

3.2.1. Le récepteur P2X₁

Le récepteur P2X₁ appartient à la famille des canaux ioniques et est activé par l'ATP [213,214]. Il est exprimé à la surface des plaquettes, à raison d'une centaine de copies par plaquette, des CML, des neutrophiles et des macrophages [215,216]. L'activation de P2X₁ par l'ATP entraîne un influx rapide de Ca²⁺ extracellulaire dans les plaquettes, conduisant au changement de forme de ces dernières et à la dégranulation [214,216–218]. La stimulation de P2X₁ par l'ATP n'entraîne pas seulement l'agrégation plaquettaire, mais promeut son amplification à divers agonistes (ADP, thrombine) [217,219–221].

Le récepteur P2X₁ ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'hémostase, puisque les souris déficientes pour ce récepteur ne présentent pas d'augmentation du temps de saignement à la queue [222,223]. Cependant, l'absence du P2X₁ réduit la taille du thrombus dans un modèle de thrombose expérimentale, principalement en présence d'un taux de cisaillement élevé (> 3 000 s⁻¹), ce qui suggère que ce récepteur canal pourrait jouer un rôle important en thrombose artérielle [219,222–224].

3.2.2. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de protéines du génome humain [225,226]. Ils sont constitués de sept hélices α transmembranaires reliées à trois boucles extracellulaires, qui contiennent des sites de liaison aux ligands, et à trois boucles intracellulaires associées à des protéines G hétérodimériques. Ces dernières initient les réponses intracellulaires spécifiques aux agonistes [213]. Les protéines G sont des hétérodimères possédant des sous-unités α , β et γ . À l'état inactif, la sous-unité G α est liée au RCPG et étroitement associée à l'unité G β -G γ . Après fixation de

l'agoniste, le RCPG est phosphorylé et induit la dissociation de la sous-unité $G\alpha$, ce qui entraîne l'interaction avec ses effecteurs et déclenche une signalisation [213,226].

3.2.2.1. Le récepteur P2Y₁

P2Y₁, un récepteur couplé à la protéine $G\alpha_q$, est exprimé dans de nombreux tissus. On en trouve sur les CE, les CML, les cellules immunitaires et les plaquettes (environ 150 copies par plaquette) [213,223,227,228]. La liaison de l'ADP au P2Y₁ entraîne l'interaction de la sous-unité $G\alpha_q$ avec la PLC β , ce qui conduit à la génération d'IP₃ et à la mobilisation des réserves de Ca²⁺ intracellulaires [213]. La signalisation P2Y₁ induit un changement de forme des plaquettes, l'activation des intégrines et l'agrégation plaquettaire. De plus, P2Y₁ participe également à l'activité procoagulante des plaquettes [213,215,223,226,229–231].

Le temps de saignement chez des souris déficientes en P2Y₁ ou inhibées au MRS2500 (un antagoniste du récepteur P2Y₁) ou des singes inhibés au MRS2500 est légèrement augmenté, ce qui indique un rôle mineur de ce récepteur dans l'hémostase [232,233]. Cependant, P2Y₁ joue un rôle important dans la thrombose artérielle puisque sa suppression ou son inhibition chez la souris ou le singe entraîne une réduction du thrombus dans des modèles de thrombose expérimentale [232,234,235].

3.2.2.2. Le récepteur P2Y₁₂

P2Y₁₂ est un récepteur couplé à la protéine $G\alpha_i$, principalement exprimé dans les plaquettes, mais on le trouve aussi dans les CML, les cellules dendritiques et certains leucocytes [213,227,236–238]. Son expression est estimée entre 450 et 1 000 copies par plaquette [239]. La liaison de l'ADP au P2Y₁₂ entraîne l'inhibition de l'adényl cyclase associée à la $G\alpha_i$, ce qui conduit à la réduction de l'AMPc, induisant une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et menant *in fine* à l'extension des filopodes et à l'agrégation plaquettaire [213,227,240,241]. La liaison de l'ADP à P2Y₁₂ entraîne une signalisation qui active PI3K, puis Akt et Rap1b, ce qui mène à l'activation de l' α IIb β 3 et à l'agrégation plaquettaire [242–244]. Le P2Y₁₂ participe également à la fonction procoagulante des plaquettes en augmentant l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes [213,230].

L'absence de P2Y₁₂ chez l'Homme se traduit par un syndrome hémorragique modeste [245–247]. Ceci est confirmé chez des souris déficientes en P2Y₁₂ qui montrent une

augmentation du temps de saignement [227,247–249]. Par ailleurs, la délétion ou l'inhibition de P2Y₁₂ chez les souris conduit à une réduction de la formation et de la stabilité du thrombus dans des modèles de thrombose expérimentale [227,247–249]. Le récepteur P2Y₁₂ est la cible de différents médicaments antithrombotiques, ce qui indique son importance en thrombose artérielle. On retrouve deux classes de médicaments : les thiénopyridines, qui sont des antagonistes irréversibles de P2Y₁₂ (clopidogrel, prasugrel), et les antagonistes réversibles comme le ticagrelor et le cangrelor. [213,239,248].

3.2.2.3. Le récepteur TP

Le récepteur du thromboxane A₂ est un récepteur couplé aux protéines Gαq et Gα_{12/13}, principalement exprimé sur les plaquettes, à hauteur de 1 000 à 2 000 copies par plaquette, mais on le retrouve également sur les CE, les CML, les monocytes et les macrophages [213,228,250–252]. Le ligand de ce récepteur est le TxA₂ dont l'action est restreinte au niveau local en raison de sa courte demi-vie (environ 30 secondes) [239,253,254]. L'activation plaquettaire permet la synthèse d'acide arachidonique, qui est ensuite métabolisé en PGH₂ instable par la COX-1, puis en TxA₂ par la TxA₂ synthase. Le TxA₂ est ensuite libéré par la plaquette [226,252,255]. La liaison du TxA₂ à son récepteur entraîne l'interaction de la sous-unité Gαq avec la PLCβ, ce qui mène à la génération d'IP₃ et la mobilisation des réserves de Ca²⁺ intracellulaires [252]. En parallèle, TP entraîne une signalisation via la sous-unité Gα_{12/13} qui active la voie de la protéine kinase associée à Rho conduisant à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, permettant le changement de forme des plaquettes [256,257]. La signalisation du récepteur TP induit donc un changement de forme des plaquettes, puis la sécrétion du contenu des granules et enfin l'agrégation plaquettaire [256,257].

Chez l'Homme, les défauts génétiques de TP entraînent des hémorragies mineures, ce qui souligne le rôle modéré de ce récepteur dans l'hémostase [258–260]. De plus, le récepteur TP joue un rôle important dans la thrombose artérielle, car sa délétion ou son inhibition chez la souris diminue la formation d'un thrombus après une lésion vasculaire localisée de plaque d'athérosclérose [252,261]. L'utilisation de l'aspirine en clinique, un médicament antiagrégant plaquettaire ciblant la COX-1 et inhibant la voie TxA₂ – TP, confirme l'importance du récepteur TP dans la thrombose artérielle [251,252,262].

3.2.2.4. Les récepteurs PAR

Les récepteurs PAR (*Proteinase Activated Receptors*) sont activés par la thrombine. Ils sont couplés à Gαq, Gα12/13 et Gαi, et majoritairement exprimés dans les plaquettes, mais on en trouve également dans les CE, les CML, les monocytes et les astrocytes [213,263–265]. Les plaquettes humaines expriment PAR1 et PAR4 à environ 1 000 à 2 000 copies par plaquette tandis que les souris expriment PAR3 et PAR4 à raison de 4 000 à 5 000 copies [213,227,228, 266]. La thrombine clive l'extrémité N-terminale extracellulaire du récepteur entre les résidus Arg41 et Ser42 afin d'exposer une nouvelle extrémité N-terminale qui peut alors se lier et activer les récepteurs PAR [213,267]. PAR1, tout comme PAR3 chez la souris, possède une séquence de type hirudine proche du site de clivage de la thrombine. Cette séquence facilite la liaison à la thrombine, mais n'est pas présente sur PAR4 [213,226,267]. Après l'activation des PAR, une signalisation est initiée via Gαq qui active la PLCβ conduisant à la mobilisation des réserves intracellulaires de Ca²⁺, tandis que l'activation régie par Gα12 de la voie de la protéine kinase associée à Rho entraîne la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et le remodelage de l'actine [213,256,268,269]. La signalisation régie par la sous-unité Gαi conduit à l'inhibition de l'adénylcyclase, induisant la réduction de l'AMPC, de la même manière que pour le récepteur P2Y₁₂ [263,268,270]. Par ailleurs, PAR1 peut être activé par une faible concentration de thrombine (1 nM), tandis que PAR4 est activé par des concentrations plus élevées (50 nM) [226,271]. Les voies de signalisation de ces deux récepteurs se complètent : le signal de PAR1 est rapide, mais s'éteint rapidement, tandis que celui de PAR4 est lent à se mettre en place, mais prolongé [263,264]. La signalisation PAR entraîne un changement de forme des plaquettes, la libération de TxA₂, la sécrétion de granules, l'activation des intégrines et l'agrégation plaquettaire [263,272,273]. Ces récepteurs sont également impliqués dans l'activité procoagulante des plaquettes qui mène à l'exposition de phosphatidylsérine à la surface de ces dernières [273].

Des données *in vivo* indiquent que la déplétion de PAR3 ou PAR4 chez la souris n'entraîne pas de formation de thrombus après une thrombose expérimentale [268,274–277]. Par ailleurs, les souris déficientes en récepteurs PAR4 ont un temps de saignement prolongé, contrairement à celles déficientes en PAR3 [267,272,274,278]. L'utilisation du vorapaxar, un inhibiteur du PAR1 recommandé dans la prévention des événements ischémiques, confirme que PAR1 joue un rôle important dans la thrombose artérielle [213,279]. Ce médicament ne

prolonge pas le temps de saignement chez les patients, ce qui indique que le ciblage de PAR1 est sûr [267,279].

B. La coagulation

La coagulation consiste en une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la génération de thrombine. Cette dernière clive les peptides N-terminaux des chaînes α et β du fibrinogène [84]. Ceci permet la transformation du fibrinogène plasmatique soluble en fibrine pour former un réseau insoluble qui consolide l'agrégat plaquettaire [12,106,280]. Deux voies de coagulation coexistent : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, conduisant toutes deux à la génération du facteur X. L'activation de ce facteur (FXa) marque le début de la voie commune, menant à la génération de thrombine [106,280] (**Figure 11**).

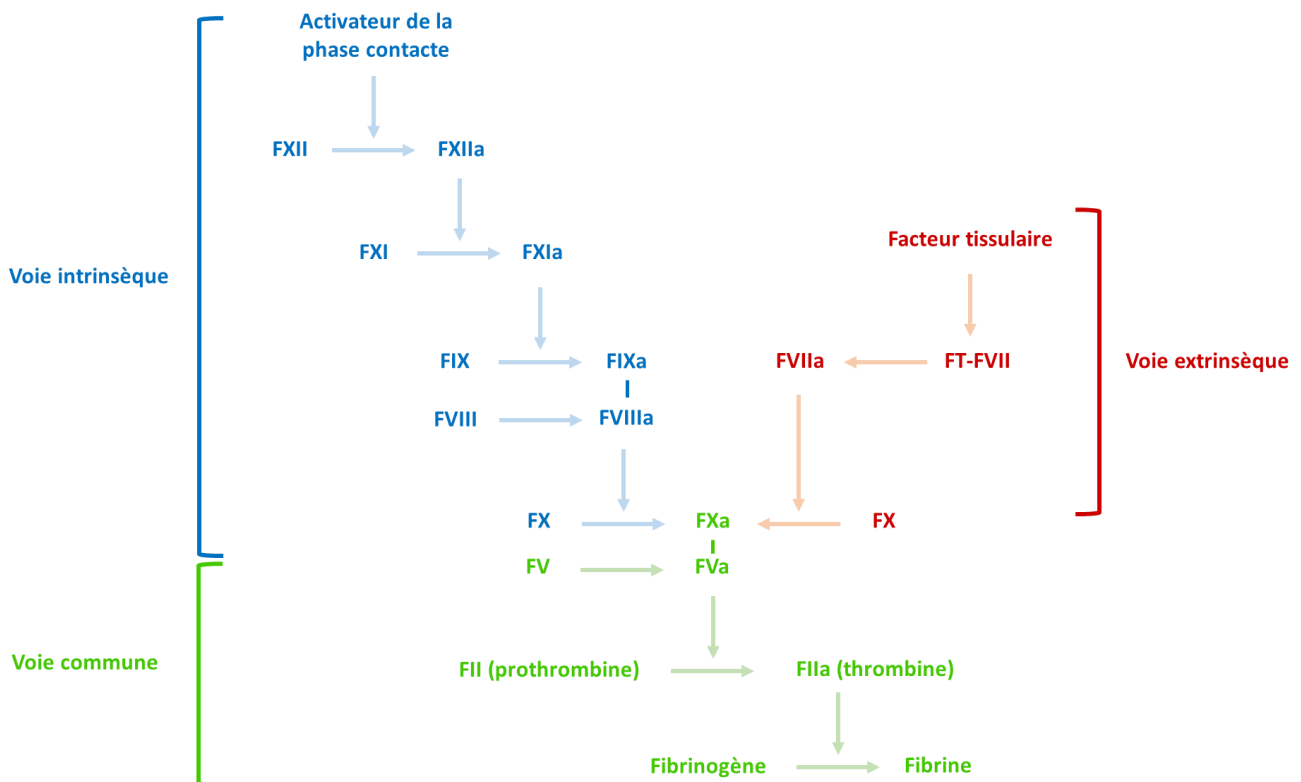


Figure 11 : Représentation schématique de la cascade de coagulation

L'activateur principal de la voie extrinsèque est le FT, une glycoprotéine transmembranaire procoagulante, aussi appelée facteur III [12,106]. Il contient trois domaines : un domaine extracellulaire composé de deux domaines *fibronectine-like*, un domaine transmembranaire qui ancre le FT à la membrane et un domaine cytoplasmique qui

est impliqué dans la transduction du signal [281,282]. Le FT n'est pas présent dans le sang en condition physiologique. Cependant, après une lésion vasculaire, il est exposé par les cellules du tissu sous-endothélial dont les CML, les fibroblastes, les cellules périvasculaires et endothéliales [106,282–284]. Le FT permet la liaison du facteur VII et conduit à son activation (FVIIa). Le complexe FT-FVIIa permet alors la liaison des facteurs de coagulation plasmatiques, à savoir les facteurs IX et X [280–282]. Cette voie est explorée *in vitro* par le temps de Quick [23].

La voie intrinsèque est initiée par le contact du facteur Hageman, appelé aussi facteur XII (FXII), avec une surface chargée négativement, entraînant son activation (FXIIa) [280,285]. Ces surfaces chargées négativement sont retrouvées *in vitro* et donc artificielles, comme le verre, le kaolin, le sulfate dextran ou la silice, mais ce phénomène a également été décrit *in vivo*, avec le collagène, les lipopolysaccharides (LPS), les acides nucléiques ou encore les phospholipides [12,285,286]. Par ailleurs, il a été montré que la phosphatidylsérine peut servir d'activateur de la phase contact *in vivo* [285,287]. Le FXIIa transforme la prékallikréine en kallikréine, une protéase qui active le FXII bien plus efficacement qu'une surface chargée négativement [280,287]. Le FXIIa conduit à l'activation des facteurs XI puis IX [12,106,280]. Le facteur IX agit alors avec son cofacteur VIII pour former un complexe et cliver le facteur X en facteur Xa [106,288]. Il est à noter que le FXII ne joue pas de rôle physiologique puisque son déficit n'est associé à aucun risque de saignement [23]. Cette voie est explorée *in vitro* par le temps de céphaline activée [23].

Le FXa produit par les voies extrinsèque et intrinsèque clive la prothrombine (FII) pour générer de la thrombine (FIIa) [289]. Bien que de nombreuses variables influencent la structure d'un thrombus riche en fibrine, la concentration de thrombine est la variable la plus importante [290]. Au début du processus, seules de très petites quantités de thrombine (< 1 nM) sont générées, mais elles sont suffisantes pour activer les facteurs V et VIII [290]. Le facteur Va se lie au facteur Xa et à la prothrombine pour former le complexe prothrombinase qui accélère la réaction de formation de thrombine [287,289–291]. Suite à cette réaction, la thrombine est générée à une concentration importante (> 100 nM) [289,290]. La thrombine catalyse la conversion du fibrinogène en filaments de fibrine et active également le facteur XIII, un facteur stabilisant de la fibrine qui renforce ses polymères, amenant la formation d'un caillot de fibrine qui stabilise les agrégats plaquettaires [12,287,290].

C. La fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus physiologique conduisant à la dissolution du caillot fibrino-plaquettaire par lyse de la fibrine par la plasmine [12,23,105,292]. La fibrinolyse permet de rétablir une circulation sanguine normale après réparation du vaisseau et limite le risque de thrombose.

La fibrinolyse est initiée par l'interaction entre le plasminogène, l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase (uPA) et la fibrine. Le plasminogène est une protéine de 92 kDa produite par les hépatocytes et qui circule dans le sang à une concentration de 180 µg/mL (2 µM). Le tPA est majoritairement synthétisé et sécrété dans la circulation par l'endothélium vasculaire, tout comme l'uPA, mais ce dernier est également exprimé par les macrophages [293–296]. Tous deux ont une demi-vie très courte dans la circulation en raison de la présence d'inhibiteurs dans le plasma, notamment l'inhibiteur de PAI-1 [294,297]. En se fixant sur la fibrine, ils activent la transformation par clivage du plasminogène en plasmine, l'enzyme protéolytique majeure de la fibrinolyse [12,23,292,295,297,298]. Cette dernière va alors cliver la fibrine et dissoudre le clou hémostatique, libérant des produits de dégradation de la fibrine (PDF) et des D-dimères [12,23]. Elle est régulée par un inhibiteur de la plasmine, l' α 2-antiplasmine (**Figure 12**).

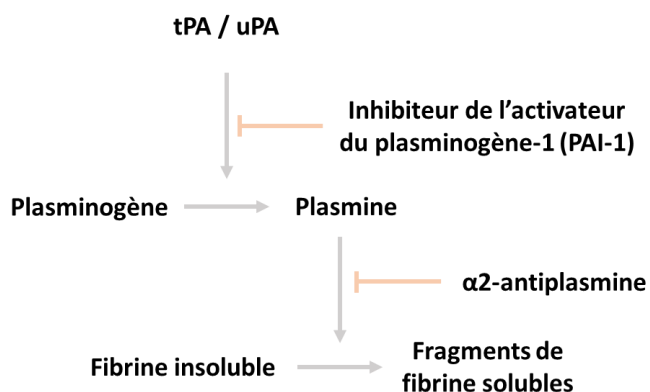


Figure 12 : Représentation schématique de la fibrinolyse

uPA : urokinase ; tPA : activateur tissulaire du plasminogène.

Bien que la plasmine dégrade également le fibrinogène, il y a très peu de risques qu'elle dégrade le fibrinogène circulant, car le plasminogène et ses activateurs possèdent une très haute affinité pour la fibrine, ce qui leur permet de rester localisés à la surface d'un thrombus riche en fibrine [12,23].

III. Introduction à la rhéologie sanguine

La rhéologie sanguine, ou hémorhéologie, est la science des propriétés physiques de l'écoulement du sang dans le système circulatoire. Elle permet notamment de comprendre le comportement des différents éléments du sang, tels que les globules rouges (GR), les plaquettes et les facteurs de coagulation, dans des conditions physiologiques ou pathologiques (en présence d'une sténose, d'un anévrisme, d'un stent) [299,300]. La mise en évidence de la corrélation de l'altération de la circulation sanguine et de nombreux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie) [301] a fortement dynamisé les progrès dans ce domaine. Ainsi le développement et la validation de modèles mathématiques et numériques capables d'intégrer les diverses conditions d'écoulement du sang permettent de prédire les possibles localisations de formation d'un thrombus, d'identifier les voies dominantes conduisant à sa croissance et d'analyser sa stabilité, ses propriétés mécaniques et son risque d'embolisation [302].

A. Les paramètres hémodynamiques majeurs

Le sang consiste en une part liquide (le plasma) et une part cellulaire (les plaquettes, les GR et les leucocytes). En raison de la présence et de l'interaction des cellules sanguines, le sang total se comporte comme un fluide non newtonien, dont la viscosité diminue de manière exponentielle avec l'augmentation du débit sanguin (**Figure 13**). Toutefois, le sang présente des propriétés non newtoniennes uniquement dans les régions où la vitesse est faible (taux de cisaillement inférieur à 100 s^{-1}), en cas de recirculation locale (exemple : les anévrismes), en aval d'une sténose, dans les veines et dans la microcirculation [299,300,303,304].

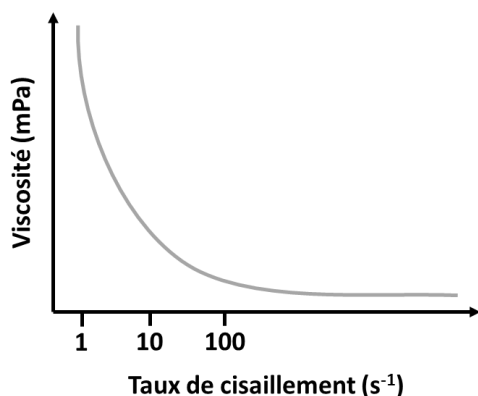


Figure 13 : Comportement d'un fluide non-newtonien en fonction du taux de cisaillement

Adapté de Baskurt & Meiselman, 2003 et Ranganath *et al*, 2020 [300,305].

Dans les artères, où la vitesse du flux est plus rapide (taux de cisaillement supérieur à 100 s^{-1} [306]), on peut considérer le sang comme un fluide newtonien, incompressible avec une viscosité constante. En considérant les vaisseaux sanguins comme des conduits cylindriques, l'écoulement du sang au travers des artères peut être assimilé à un écoulement de Poiseuille. Cela signifie que le sang possède un profil de vitesse parabolique, avec une vitesse maximale au centre du vaisseau et une réduction de cette dernière à l'approche de la paroi du vaisseau, où elle devient théoriquement nulle (**Figure 14**). Ainsi, l'écoulement du sang est modélisé sous forme de strates de fluide glissant les unes sur les autres, appelé écoulement laminaire [299,300,303,304,307,308].

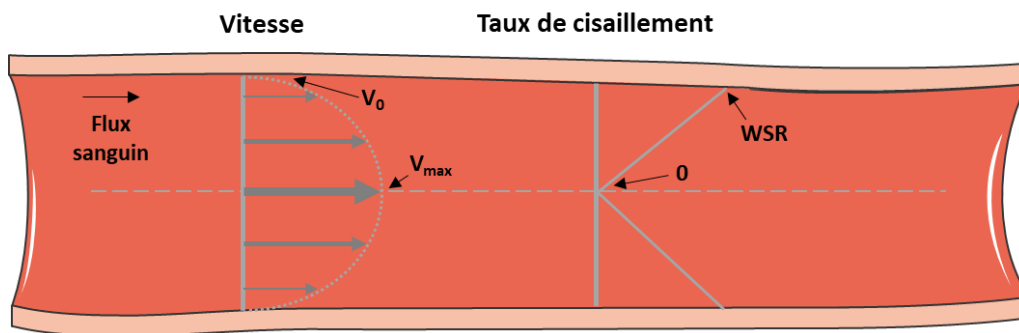


Figure 14 : Schématisation du profil de vitesse du sang suivant une loi de Poiseuille

V_{\max} : vitesse maximale au centre du vaisseau ; V_0 : vitesse minimale à la paroi ; WSR : taux de cisaillement à la paroi. Adapté de Kroll & Hellums, 1996 [308].

Pour caractériser un écoulement laminaire, les deux paramètres clés sont le taux de cisaillement (*Shear Rate* : SR) et la contrainte de cisaillement (*Shear Stress* : SS) [303,307,309]. Le taux de cisaillement (s^{-1}) caractérise la vitesse relative entre deux strates de fluide, tandis que le taux de cisaillement à la paroi (*Wall Shear Rate* : WSR) est le gradient de vitesse entre la couche de fluide la plus proche de la paroi et la paroi. Le WSR $[\dot{\gamma}]$ est proportionnel au débit $[Q]$ et inversement proportionnel au rayon $[r]$ du conduit (équation 1). Il est donc maximal à la paroi et minimal au centre de la lumière.

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi r^3} \quad (\text{équation 1})$$

La contrainte de cisaillement (dynes/cm^2) représente quant à elle la force tangente entre deux strates de fluide ou entre la couche de fluide la plus proche de la paroi et la paroi pour la contrainte de cisaillement à la paroi (*Wall Shear Stress* : WSS). Le WSS $[\tau]$ est dépendant du WSR $[\dot{\gamma}]$ et de la viscosité du fluide $[\eta]$, qui représente la résistance d'un fluide à l'écoulement (équation 2) :

$$\tau = \dot{\gamma} \cdot \eta \quad (\text{équation 2})$$

B. Rôle du flux sanguin dans la régulation de l'hémostase

Les GR constituent la partie dominante de la masse cellulaire du sang. Par leur forme et leur déformabilité, ils subissent des forces de portance qui vont les éloigner de la paroi. Ils sont donc généralement localisés au centre de la circulation sanguine et poussent les autres cellules vers les parois, un processus appelé margination, créant une couche de plaquettes et de leucocytes près de la paroi du vaisseau, ce qui est important pour leurs fonctions [309,310].

Le flux sanguin régule toutes les étapes de la formation d'un thrombus dont l'adhérence, l'activation et l'agrégation des plaquettes à la suite d'une lésion vasculaire. En effet, en conditions de flux faibles ($< 1000 \text{ s}^{-1}$), tous les récepteurs permettant l'adhérence des plaquettes ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, GPIb-IX-V) suffisent pour l'étape initiale d'attachement des plaquettes en interagissant avec la matrice sous-endothéliale [304,311,312]. Lors de flux plus élevés, l'interaction FW – GPIb α est essentielle. Ceci est rendu possible par les contraintes de cisaillement élevées qui déplient les fibres de FW immobilisées au site de lésion vasculaire, lui permettant d'exposer notamment son domaine A1 et d'interagir avec la sous-unité GPIb α des plaquettes. Une fois les plaquettes adhérentes, les forces hémodynamiques peuvent stimuler les mécanosenseurs, comme la GPIb α qui va induire une signalisation intracellulaire [313,314].

Le flux sanguin a également un effet de dilution des agonistes solubles plaquettaires, ce qui va limiter l'activation locale et éviter une occlusion vasculaire qui ne serait pas souhaitable [311,312,315]. Enfin, une fois l'agrégat formé, les forces de cisaillement tendent à rompre les liaisons récepteur/ligand et récepteur/récepteur, favorisant ainsi l'instabilité du thrombus et sa désagrégation.

C. Modification de l'écoulement sanguin dans une sténose et impact sur la thrombose

La présence d'une sténose, d'une plaque d'athérosclérose ou d'un thrombus implique des perturbations importantes de l'écoulement sanguin, appelé l'effet Venturi. On retrouve une décélération du flux dans la région pré-sténotique, suivie d'une accélération dans cette même région, menant à des vitesses et des taux de cisaillements extrêmes dans la gorge de la sténose (WSR jusque $40\ 000\ s^{-1}$ et WSS à plus de $1\ 500\ dynes/cm^2$). La fin de la zone pré-sténotique, et la gorge de la sténose, génèrent respectivement une accélération des flux et des taux de cisaillement extrêmes qui facilitent le dépliement du FW en solution, exposant son domaine A1 et favorisant l'agrégation plaquettaire en suspension (**Figure 15**) [304,307,315–319].

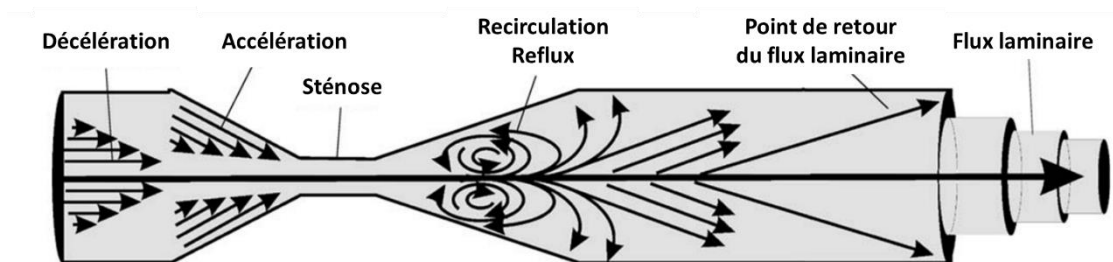


Figure 15 : Schématisation de l'écoulement des flux en présence d'une sténose

D'après Nesbitt *et al*, 2006 [307].

Dans la zone post-sténotique, la diminution de la vitesse mène à une perturbation des flux, avec des zones de recirculation, de stase, voire de flux inversés qui sont thrombogènes. En effet, ces perturbations permettent notamment aux cellules endothéliales d'exprimer plus de FT et ainsi de faciliter la génération de thrombine et le recrutement de plaquettes au site de thrombose. De même, ces perturbations exposent les plaquettes à un environnement rhéologique complexe et changeant. Des preuves expérimentales ont démontré que le degré de perturbation du flux est en corrélation directe avec l'ampleur de l'agrégation plaquettaire, car il favorise notamment l'accumulation de leurs agonistes solubles dans la zone post-sténotique. Enfin, les agonistes plaquettaire s'accumulent dans ces régions de flux perturbés, renforçant ainsi l'accumulation et l'activation plaquettaire en aval du site de la lésion vasculaire [307,315].

D. Modification de l'écoulement sanguin lors de l'implantation d'un dispositif endovasculaire

L'implantation d'un stent dans un vaisseau sténosé permet de rouvrir ce dernier. Toutefois, la présence du matériel va modifier l'environnement rhéologique, et affecter le comportement physiologique des cellules endothéliales, ce qui peut entraîner des complications (voir **chapitres IV à VI**) [320].

Il a été montré par une approche numérique que l'implantation d'un stent dans un vaisseau conduit à une perturbation légère des lignes de courant à proximité des stents. Les mailles d'un stent perturbent différemment le flux selon son positionnement [320]. Une zone de stagnation des particules se forme plus facilement dans la partie proximale du stent parce que la vitesse des GR est quasi nulle et que le temps de résidence (durée moyenne pendant laquelle les particules se trouvent dans la zone) de ces derniers est long [316,320]. Un temps de résidence élevé facilite également l'adhérence et l'activation des plaquettes, ce qui semble se confirmer par le fait que des agrégats se forment entre les mailles du stent où la contrainte de cisaillement est très faible. Par ailleurs, ce phénomène faciliterait le dépôt de diverses molécules (facteurs de coagulation, cellules inflammatoires), affectant la croissance des cellules endothéliales et musculaires et fournissant un environnement favorable à la resténose et à la formation de néo-plaques d'athérosclérose [316,320,321].

IV. La thrombose artérielle

La thrombose artérielle est définie comme la formation d'une masse organisée de cellules sanguines, appelée thrombus, pouvant obstruer une artère dans un contexte pathologique. Il s'agit de la complication ultime d'une pathologie vasculaire chronique appelée athérosclérose, de laquelle résulte la formation de plaques athéromateuses [322]. Lorsque la plaque croît dans la lumière du vaisseau, elle modifie la géométrie de l'artère en formant une sténose qui a un impact majeur sur l'hémodynamique locale en générant des flux thrombogènes [307]. La rupture d'une plaque expose au flux sanguin ses composants hautement thrombogènes, tels que le collagène fibrillaire et le FT, entraînant la formation d'un thrombus qui peut devenir occlusif et déclencher des pathologies ischémiques graves [323,324]. L'ischémie réduit l'apport en oxygène des cellules environnantes, menant à la mort cellulaire et à diverses pathologies selon l'artère touchée : i) un IM lorsque la thrombose touche les artères coronaires, ii) un AVC ischémique lorsqu'un embole se détache du thrombus au niveau de la carotide et obstrue une artère cérébrale, ou iii) une AOMI lorsque les artères fémorales ou poplitées sont concernées [325].

A. L'athérogénèse

L'athérosclérose est la cause principale de la thrombose artérielle. Il s'agit d'une pathologie inflammatoire vasculaire chronique qui entraîne un rétrécissement de la lumière de l'artère par accumulation d'une plaque dans la paroi des artères de moyenne et grande taille [326–329]. Ces plaques sont initiées dans les artères où la présence de courbures et bifurcation perturbe le flux sanguin, qui s'écarte alors d'un schéma unidirectionnel laminaire [307,323,328]. Chez l'Homme, cela concerne généralement à savoir l'aorte, les artères coronaires, carotides et cérébrales [10,307,328–330]. Il a été noté des différences dans la localisation de formation de plaque selon les populations. En effet, les populations caucasiennes sont plus à même de faire des plaques au niveau de la carotide tandis que les populations asiatiques en développent au niveau intracérébral. Cependant, cette différence n'a pour le moment pas été expliquée.

L'athérosclérose est un processus silencieux qui se développe sur de nombreuses années et est initié par des taux plasmatiques élevés de LDL [329–332]. Ces dernières s'accumulent progressivement dans l'intima des parois artérielles par endocytose, où elles s'oxydent [329,332,333]. Cette oxydation déclenche une réponse inflammatoire qui active les cellules endothéliales, permettant le recrutement dans l'intima de cellules immunitaires circulantes et de cellules pro-inflammatoires, à savoir les monocytes qui se différencient alors en macrophages et les lymphocytes [331,334–336]. Les macrophages vont ensuite phagocyter les LDL oxydées et se transformer en cellules spumeuses [329,330,336–338]. Ce phénomène est suivi par la migration et la prolifération des CML de la média vers l'intima où elles synthétisent des composants de la MEC tels que le collagène et l'élastine formant la chape fibreuse qui recouvre et stabilise la plaque, limitant ainsi son risque de rupture [329,331,336]. Les cellules spumeuses et les CML au centre de la plaque subissent une apoptose ou une nécrose, ce qui entraîne la libération de LDL oxydées et génère une zone riche en cholestérol et débris cellulaires, appelée cœur lipidique ou cœur nécrotique de la plaque [326,329–331,339,340] (**Figure 16**). À un stade avancé, les cellules immunitaires activées produisent des cytokines qui induisent la sécrétion de métalloprotéinases matricielles entraînant la dégradation des collagènes et l'amincissement de la chape fibreuse [341]. De plus, la présence de calcifications dans le cœur lipidique par la cristallisation de calcium et de phosphate et d'une néo-vascularisation influencent la stabilité de la plaque [323,328,330,331].

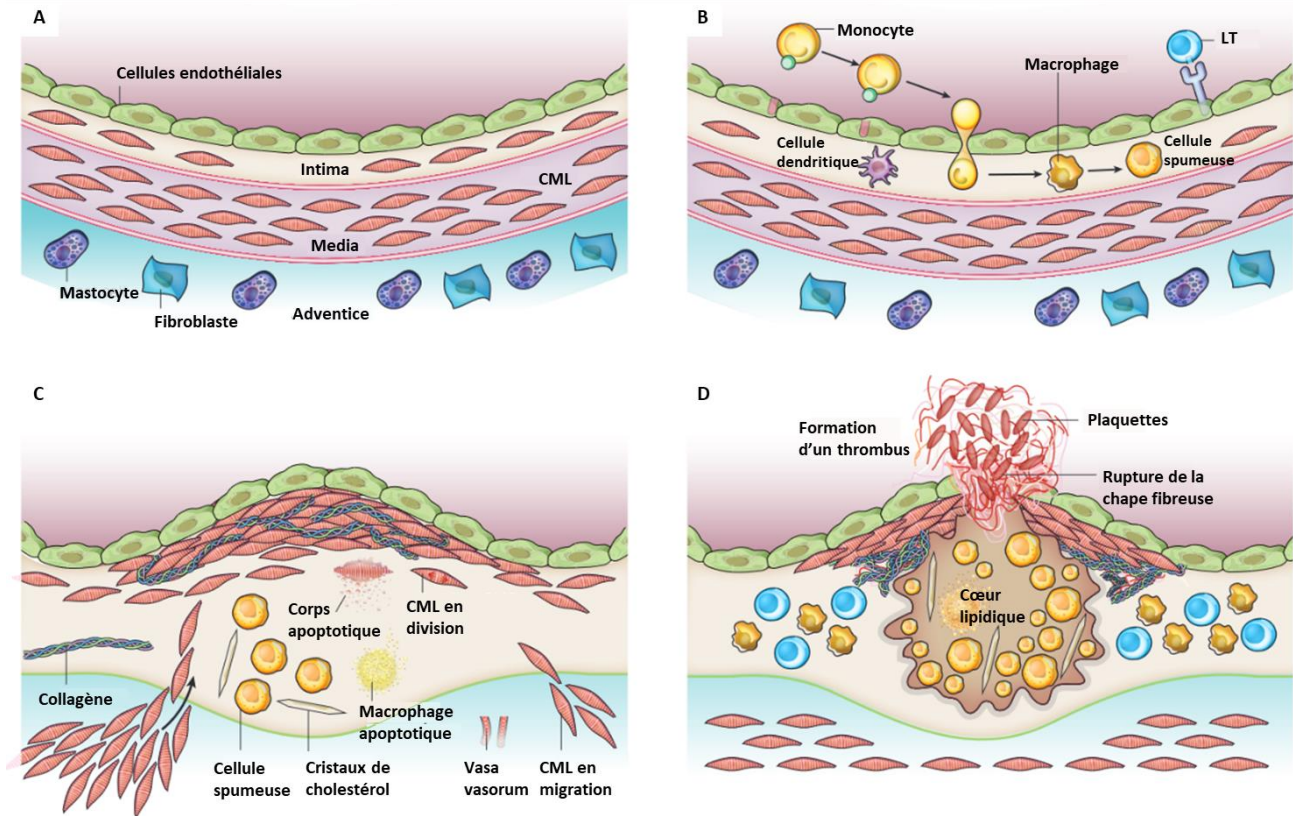


Figure 16 : Schéma du développement et de la progression d'une plaque athérosclérose

CML : cellules musculaires lisses ; LT : lymphocyte T. D'après Libby *et al*, 2011 [329].

Si la plaque contient une quantité limitée de lipides et est recouverte d'une chape fibreuse épaisse, elle est considérée comme une "plaque stable", avec une probabilité de rupture faible. Au contraire, si la plaque possède un noyau lipidique recouvert d'une chape fibreuse fine, elle est considérée comme "vulnérable", avec une probabilité d'érosion ou de rupture élevée, notamment sous l'effet des forces du flux [323,328,330,331,335,342,343].

Lorsque la plaque croît dans la lumière du vaisseau, elle modifie la géométrie de l'artère en formant une sténose qui a un impact majeur sur l'hémodynamique locale. Une plaque évoluée qui entraîne une sténose sévère génère des flux thrombogènes, comme une accélération du flux avant l'entrée de la sténose ou une région de recirculation à la sortie de la sténose [307,322]. Une plaque évoluée peut être stable pendant une longue période et se rompre sous l'effet des forces du flux sanguin et des métalloprotéinases, exposant ainsi à la circulation sanguine une surface hautement thrombogène contenant notamment du FT et du

collagène, qui initie la thrombose. L'exposition de ces composants thrombogènes, notamment du FW et du collagène, vont permettre respectivement l'adhérence puis l'activation des plaquettes qui vont alors agréger entre elles par l'interaction Fg- α IIb β 3 [344]. De même, l'expression et la libération de TF va permettre d'activer la voie de la coagulation, conduisant à la génération de fibrine, consolidant l'agrégat plaquettaire, pouvant mener jusqu'à un évènement cardiovasculaire ischémique [344] (**Figure 17**).

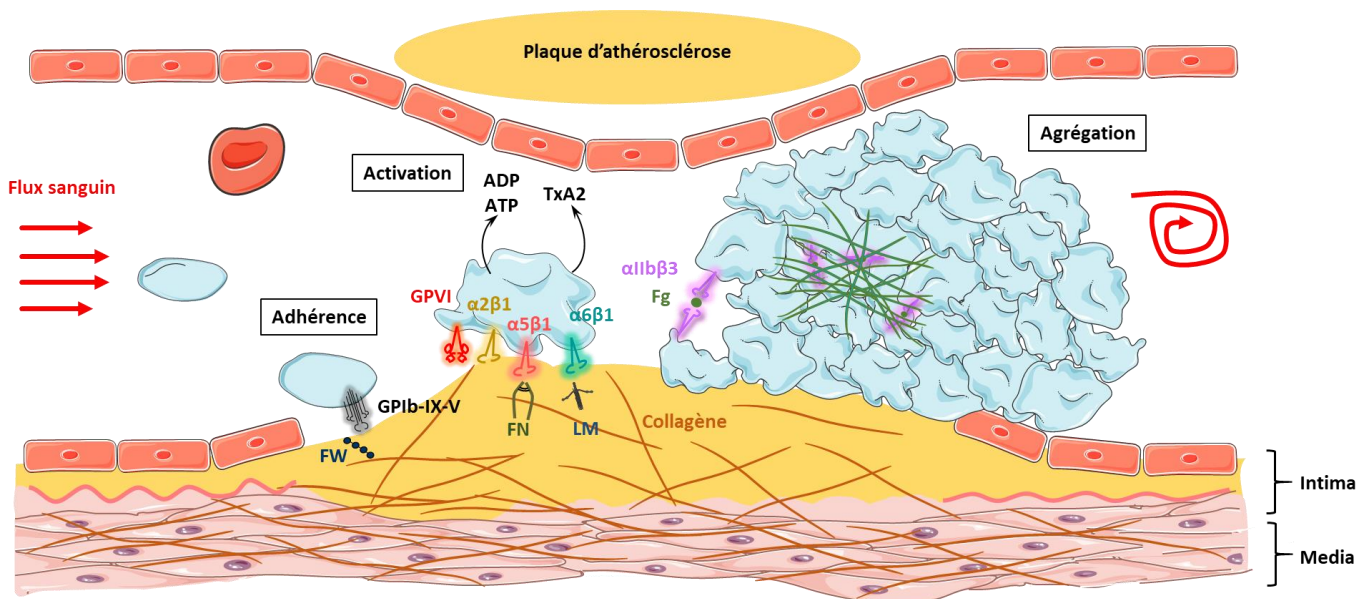


Figure 17 : Les mécanismes moléculaires de la thrombose artérielle

ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; Fg : fibrinogène ; FN : fibrine ; GP : glycoprotéine ; LM : laminines ; TxA2: thromboxane A2.

B. Prévention et traitements de la thrombose artérielle

La prise en charge de la thrombose artérielle dépend de sa gravité et de l'artère touchée. Son traitement consiste généralement en une approche pharmacologique qui peut être combinée à une approche endovasculaire ou chirurgicale dans le but de traiter la thrombose initiale, de rétablir une circulation normale et d'empêcher la récurrence.

1. L'approche pharmacologique

Le traitement médicamenteux basé sur des agents antiplaquettaires représente un élément central de la prise en charge de la thrombose artérielle. Ces agents ont permis de réduire : i) la mortalité de la thrombose artérielle en phase aiguë, ii) la survenue de la thrombose lors d'une angioplastie et iii) la récurrence lorsqu'ils sont utilisés en prévention secondaire. Ils ciblent aussi bien l'activation plaquettaire par l'inhibition de la COX-1 ou le récepteur P2Y₁₂, que l'agrégation plaquettaire en inhibant l'intégrine α IIb β 3 (Figure 18).

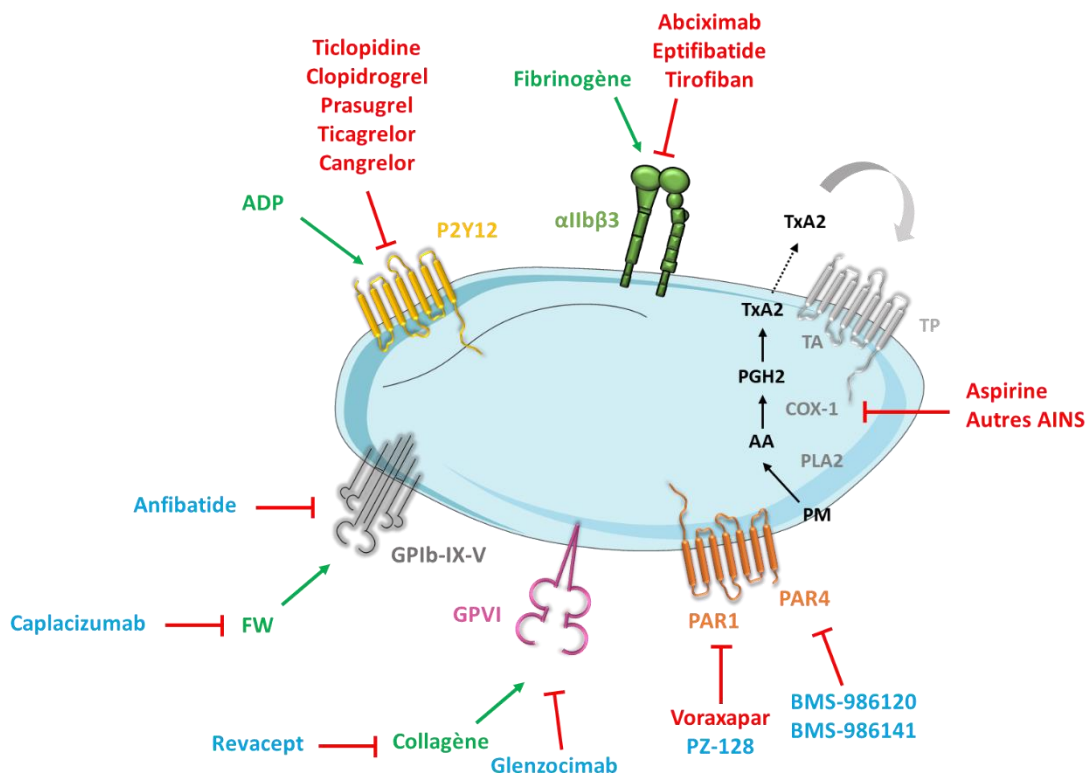


Figure 18 : Mécanismes d'action des antiplaquettaires utilisés en clinique et en cours de développement

En rouge : les agents utilisés en clinique ; en bleu : les agents en cours de développement ; en vert : les ligands. AA : acide arachidonique ; ADP : adénosine diphosphate ; AINS : agents anti-inflammatoires non stéroïdiens ; COX : cyclooxygénase ; FW : facteur de Willebrand ; GP : glycoprotéine ; PLA2 : phospholipase A2 ; PGH2 : prostaglandine H2 ; PM : phospholipides membranaires ; TA : TxA2 synthase ; TP : récepteur TxA2 ; TxA2 : thromboxane A2.

1.1. L'aspirine

L'aspirine, ou acide acétylsalicylique, est le premier agent antiplaquettaire à avoir été identifié dans le traitement de la thrombose artérielle et elle reste largement prescrite en clinique [345]. Elle inhibe les COX de manière irréversible par acétylation d'un résidu sérine, empêchant ainsi la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines. Ceci limite la formation de TxA₂, un agoniste fort des plaquettes, qui active les récepteurs TP [346–348].

L'aspirine possédant quatre effets (antalgique, antipyrétique, antiinflammatoire et antiplaquettaire), son utilisation peut s'accompagner d'effets indésirables tels que des saignements gastro-intestinaux ou des ulcères gastriques [349]. En effet, il existe deux isoformes de COX : les plaquettes expriment uniquement la COX-1 tandis que les cellules endothéliales vasculaires expriment à la fois la COX-1 et la COX-2 [350]. L'aspirine n'étant pas sélective de la COX-1 plaquettaire, elle inhibe également la COX-2 qui synthétise des prostaglandines protégeant la muqueuse gastro-intestinale. Pour limiter les effets secondaires gastriques, l'aspirine est administrée quotidiennement à dose faible (75 à 100 mg/jour) afin d'assurer une inhibition de la COX-1 plaquettaire tout en limitant l'impact sur la COX-2 dans le traitement et la prévention secondaire des maladies cardiovasculaires thrombotiques telles que l'IM et l'AVC.

1.2. Les antagonistes du récepteur P2Y₁₂

Une autre classe d'antiplaquettaires très utilisée en clinique est celle des antagonistes du récepteur P2Y₁₂, un récepteur à l'ADP qui joue un rôle majeur dans l'amplification de l'activation des plaquettes et en hémostase [351]. Deux classes d'antagonistes existent et se différencient par leur mécanisme d'action : les thiénoxyridines et les inhibiteurs directs du récepteur P2Y₁₂. Les thiénoxyridines (clopidogrel, prasugrel) sont des prodrogues métabolisées par des enzymes hépatiques telles que le cytochrome P450, dont les métabolites actifs inhibent de manière irréversible le récepteur P2Y₁₂. Les inhibiteurs directs et réversibles du récepteur P2Y₁₂ sont des analogues de l'ADP et comprennent le ticagrelor et le cangrelor [345,351]. Il n'existe pas de recommandation concernant la réversion du traitement antiplaquettaire. La transfusion de plaquettes est considérée comme inefficace pour inverser les effets antiplaquettaires des inhibiteurs de P2Y₁₂ [352].

Ces antiplaquettaires sont utilisés dans la prévention et le traitement des évènements thrombotiques tels que le syndrome coronarien aigu, la TS et l'AVC ischémique [353–355]. Puisque le récepteur P2Y₁₂ est impliqué dans l'hémostase primaire, son inhibition accroît le risque de saignement, qui augmente avec le degré d'inhibition du récepteur. Ceci explique que les doses utilisées en clinique ne favorisent qu'une inhibition de 50-60 % de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Toutefois, en cas d'urgence les praticiens peuvent utiliser des doses capables d'inhiber 90% de l'agrégation plaquettaire [223,345,356,357].

1.3. La bithérapie antiplaquettaire

Des essais cliniques ont démontré que la combinaison de l'aspirine et d'un antagoniste du récepteur P2Y₁₂, appelée bithérapie antiplaquettaire, est plus efficace que les agents utilisés seuls et représente, de ce fait, le traitement de référence pour la prévention secondaire de la thrombose artérielle et de la thrombose de stent [358–361].

En effet, l'étude CURE a démontré qu'une bithérapie composée d'aspirine et de clopidogrel réduit davantage les évènements cardiovasculaires que l'aspirine seule à un an, mais elle s'accompagne cependant d'un risque accru d'hémorragie majeure chez les patients souffrant d'un syndrome coronarien aigu [360,362]. De même, l'étude CHARISMA a montré que l'association de l'aspirine et du clopidogrel est également plus efficace que l'aspirine ou le clopidogrel seul pour réduire le risque d'évènements cardiovasculaires sur vingt-huit mois chez des patients à haut risque d'évènement athérothrombotiques [358]. Par ailleurs, l'étude TRITON-TIMI a indiqué que l'association prasugrel/aspirine s'est révélée plus efficace que l'association clopidogrel/aspirine pour réduire les décès d'origine cardiovasculaire chez des patients ayant un syndrome coronarien aigu subissant une PCI programmée. Toutefois, cette association s'est également accompagnée d'un taux significativement plus élevé d'hémorragies mettant en jeu le pronostic vital des patients [363].

Il est à noter que, bien que recommandée à la suite d'un syndrome coronarien aigu, la bithérapie antiplaquettaire n'est toutefois pas indiquée après un AVC ischémique en raison du risque élevé de transformation hémorragique, qui peut être fatale pour le patient [364].

1.4. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Une troisième classe d'antiplaquettaires utilisés en clinique concerne les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [167]. Elle comprend actuellement l'abciximab (ReoPro®), un fragment Fab d'un anticorps monoclonal, l'eptifibatide (Integrilin®), un heptapeptide cyclique, et le tirofiban (Aggrastat®), un composé de synthèse dérivé de la tyrosine [365–367]. Contrairement à l'aspirine et aux antagonistes du récepteur P2Y_{12} , les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ n'empêchent pas l'activation plaquettaire, mais bloquent directement l'agrégation plaquettaire en bloquant l'interaction entre l'intégrine et son ligand, le fibrinogène [368]. Ces agents thérapeutiques sont administrés par voie intraveineuse dans des situations d'urgence comme l'IM ou lors d'interventions coronariennes percutanées [369].

Ce sont des agents antiplaquettaires très efficaces, mais comportant également un risque hémorragique important, qui est plus élevé que celui des antagonistes des récepteurs P2Y_{12} [370–373]. En conséquence, ils ne sont utilisés qu'en phase aiguë des pathologies thrombotiques et ne sont pas recommandés en traitement secondaire.

2. Les nouveaux traitements antiplaquettaires

Les effets secondaires des agents antiplaquettaires et/ou leur manque d'efficacité ont conduit au développement de nouvelles stratégies. Certaines de ces cibles semblent prometteuses, telles que la $\text{GPIIb}\alpha$, qui joue un rôle clé dans l'adhérence des plaquettes en cas de brèche vasculaire, ou encore la GPVI , dont l'inhibition pourrait entraver la thrombose tout en préservant l'hémostase, ce qui représente une stratégie antithrombotique sûre (**Figure 18**).

2.1. Les inhibiteurs de l'axe GPIIb/FW

L'interaction entre le complexe GPIIb-IX-V et le FW est une étape clé de l'adhérence des plaquettes à la paroi vasculaire et de la croissance du thrombus. Il a été montré dans différents modèles expérimentaux de thrombose que le blocage du récepteur GPIIb ou de son ligand, le FW, empêche la formation du thrombus (voir section **II.A.3.1.1**).

L'importance de cet axe dans la thrombose a mené au développement d'un Fab d'un anticorps ciblant le domaine A1 du FW, bloquant ainsi sa liaison avec la $\text{GPIIb}\alpha$: le

caplacizumab. Il s'est imposé comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge du purpura thrombotique thrombopénique, car le traitement normalise rapidement la numération plaquettaire et réduit le risque de décès et d'évènements thromboemboliques liés à la pathologie. Cependant, étudiés en association avec la bithérapie antiplaquettaire chez des patients atteints d'un syndrome coronarien aigu et ayant subi une intervention coronaire percutanée (PCI), les résultats ont indiqué que son usage entraîne des saignements similaires à ceux de la bithérapie associée à l'abciximab [374].

Un agent ciblant le complexe GPIIb-IIIa a également été développé : l'anfibatide. Ce dérivé d'un venin de serpent est un antagoniste direct de la GPIIb/IIIa, qui bloque la liaison du Fc. Il a été démontré que l'anfibatide inhibe l'adhérence et l'agrégation plaquettaire ainsi que la thrombose expérimentale sans provoquer de saignements chez la souris. De plus, il possède un effet protecteur lors d'un AVC ischémique et sur les lésions de reperfusion chez la souris [375,376]. Une étude clinique de phase Ib/IIa évaluant la sécurité et l'efficacité de l'anfibatide chez des patients présentant un IM avant une PCI a montré que ce candidat-médicament est sûr pour le patient et permet l'inhibition de l'agrégation plaquettaire sans augmentation du risque de saignement ou de diminution de la numération plaquettaire.

2.2. Les inhibiteurs de la GPVI

Il a été montré chez l'Homme que l'absence de GPVI sur les plaquettes n'a pas d'impact majeur sur l'hémostase. En revanche, son ciblage réduit la thrombose expérimentale chez la souris (voir section II.A.3.1.2.). Ces éléments impliquent que la GPVI est considérée comme une cible antithrombotique plus sûre.

Un candidat-médicament, le revacept, est une protéine dimérique recombinante composée de deux ectodomains de GPVI fusionnés à la région Fc de l'immunoglobuline humaine (IgG1). Il se lie de manière compétitive au collagène et empêche l'activation des plaquettes par l'intermédiaire de la GPVI et de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Dans un essai de phase I, il a été démontré que le revacept n'affecte pas le temps de saignement des volontaires sains, tout en inhibant l'agrégation induite par le collagène de manière dose-dépendante *ex vivo* [377]. Un essai clinique de phase II, évaluant la sécurité et l'efficacité du revacept lorsqu'il est administré en association avec de l'aspirine ou du clopidogrel chez des patients présentant

une sténose symptomatique de l'artère carotide interne, a démontré qu'il réduisait les risques d'évènements cérébrovasculaires récurrents (nouvel AVC, embolisation, nouvelles lésions ischémiques) de 54 % par rapport au bras témoin [378]. Un autre essai clinique de phase II chez des patients atteints d'une maladie coronarienne subissant une PCI a montré que le revacept ne réduit pas les lésions myocardiques aux doses évaluées [379]. Le revacept ne semble donc pas être un candidat-médicament efficace pour cette indication.

Un autre agent ciblant spécifiquement la GPVI, le glenzocimab (anciennement 9O12 et ACT017), a été développé par Acticor Biotech. Il s'agit d'un fragment Fab d'un anticorps humanisé présentant une spécificité et une affinité élevées pour la GPVI. Son prédécesseur, l'anticorps murin 9O12, réduit la thrombose expérimentale chez des souris humanisées pour la GPVI [158]. Chez des primates, il a été montré qu'ACT017 inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le collagène *ex vivo* sans réduire la numération plaquettaire ou induire d'effets secondaires hémorragiques [380]. De même, dans un essai clinique de phase I chez des volontaires sains, ACT017 n'a pas montré d'évènements indésirables majeurs, d'augmentation du temps de saignement, de modification de la numération et de l'expression plaquettaire de la GPVI [381,382]. De plus, l'essai de phase Ib/IIa, ACTIMIS, qui a évalué l'effet du glenzocimab en plus du traitement de référence (thrombolyse et/ou thrombectomie) de l'AVC ischémique, indique que cet agent est sûr et diminue la fréquence des transformations hémorragiques, ce qui permet de réduire de trois fois la mortalité par rapport au bras témoin [383–385].

2.3. Les inhibiteurs des récepteurs PAR

Les récepteurs plaquettaires PAR jouent un rôle majeur dans l'activation des plaquettes après la liaison de leur ligand, la thrombine. Deux récepteurs PAR sont retrouvés sur les plaquettes humaines, PAR1 et PAR4 (voir section **II.A.3.2.2.4.**).

Une classe d'agent antithrombotique nouvellement utilisée en clinique est celle ciblant le récepteur PAR1, qui est impliqué dans la thrombose artérielle. Le vorapaxar est un inhibiteur compétitif réversible et spécifique de PAR1. Il s'agit du premier antagoniste de cette classe approuvé par la FDA aux États-Unis et l'EMA en Europe. Il a été mis sur le marché en 2014 pour la prévention secondaire d'évènements ischémiques en complément du traitement

par bithérapie antiplaquettaire [386,387]. Cependant, s'agissant d'un inhibiteur avec une très longue durée d'action (inhibition jusqu'à trois semaines après une seule dose), il peut interférer avec l'activation des plaquettes par la thrombine en hémostase, augmentant ainsi le risque de saignements, limitant donc les catégories de patients pouvant y prétendre [352,387,388]. Malgré son autorisation de mise sur le marché, le vorapaxar n'est pas utilisé en clinique. Le PZ-128, une pepducine (lipopeptide membranaire qui pénètre les cellules et cible le domaine cytoplasmique des récepteurs), est un nouvel inhibiteur de PAR1 en cours de développement. Il agit comme un agent antiplaquettaire réversible, avec un mode d'action rapide, qui pourrait permettre de prévenir les événements ischémiques associés à la PCI. L'efficacité et la sûreté du PZ-128 ont été démontrées dans un essai clinique chez des patients souffrant d'une maladie thrombotique (maladie coronarienne, antécédents d'IM, de PCI ou de pontage) ou présentant au moins deux facteurs de risque de maladie coronarienne [389]. De même, il a été montré que le PZ-128 n'augmentait pas les saignements et diminuait légèrement les événements coronariens majeurs par rapport au groupe placebo chez des patients subissant une cathétérisation cardiaque, puis une PCI [390].

Des antagonistes du récepteur PAR4 sont également en cours de développement. Le BMS-986120 est une petite molécule antagoniste puissante et réversible, spécifique de PAR4, qui bloque l'activation plaquettaire par la thrombine. Il a été montré dans une étude préclinique utilisant un modèle de thrombose chez le primate, que le BMS-986120 et le clopidogrel réduisent la thrombose de manière similaire, mais seul le premier n'impacte pas le temps de saignement [391]. Dans une étude de phase I, le BMS-986120 administré à des volontaires sains ne provoque pas de saignements spontanés, inhibe l'activation plaquettaire induite par PAR4 *ex vivo* et réduit la croissance du thrombus *ex vivo* de manière similaire à celle de l'aspirine et du clopidogrel [392]. Le BMS-986141, un autre antagoniste de PAR4, plus puissant que le BMS-986120, présente un risque de saignement faible dans des études précliniques. Ceci a été confirmé dans un essai clinique de phase I qui montre qu'il a été bien toléré. Un essai de phase II a été lancé pour déterminer si le BMS-986141 réduisait les AVC secondaires chez des patients ayant récemment subi un AVC ou un accident ischémique transitoire (AIT) et ayant tous reçu de l'aspirine (NCT02671461), mais l'étude a été interrompue prématurément sans explication.

3. Les approches endovasculaires et chirurgicales

En plus de l'approche pharmacologique, les cliniciens utilisent aussi une approche endovasculaire ou chirurgicale (**Figure 19**).

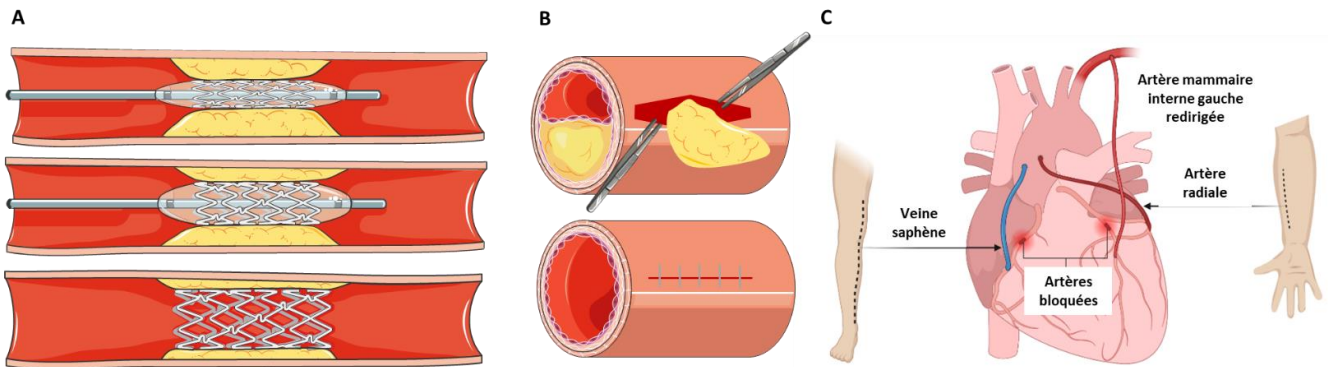


Figure 19 : Les principales techniques chirurgicales de revascularisation

Schématisation (A) d'une angioplastie avec pose de stent, (B) d'une endartériectomie et (C) d'un double pontage coronarien.

3.1. L'approche endovasculaire

L'approche endovasculaire est une angioplastie, ou intervention transluminale percutanée, consistant à introduire dans l'artère radiale ou fémorale (selon le vaisseau à traiter) un cathéter guidé jusqu'à l'artère obstruée [393,394]. Ce cathéter est muni à son extrémité d'un petit ballon dont le gonflement dilate l'artère en écrasant la plaque d'athérosclérose. Cette procédure peut s'accompagner de la pose d'un stent (voir **chapitre V**) qui maintient le vaisseau ouvert et permet de rétablir une circulation sanguine normale [395,396]. Cette technique, non invasive, a permis une avancée majeure dans le traitement des pathologies ischémiques avec une réduction importante de la mortalité et de la morbidité grâce à sa capacité à permettre une revascularisation rapide du tissu lésé.

L'athérectomie est une alternative à l'angioplastie. Un cathéter est alors muni d'un outil permettant de retirer la plaque d'athérosclérose de manière non invasive [397]. L'athérectomie rotationnelle consiste en l'utilisation d'une fraiseuse tournant à très grande vitesse, meulant la plaque en très petites particules capables d'être éliminées sans danger par

l'organisme. L'athérectomie directionnelle gonfle un ballon au niveau de la plaque, ce dernier possédant une lame qui va découper la plaque et la stocker dans une chambre spéciale. Le dégonflage du ballon permet ensuite de retirer la plaque stockée avec le cathéter. Enfin, l'athérectomie transluminale utilise des lames rotatives pour découper la plaque et un tube fixé au cathéter aspire alors les débris produits.

L'embolectomie est une approche qui consiste à retirer les embolies à l'aide d'un cathéter à ballonnet, par la méthode de Fogarty. Ce dernier est introduit en amont de l'embolie et poussé au travers jusqu'à atteindre son aval. Le ballonnet est ensuite gonflé et le cathéter retiré pour ramener l'embolie jusqu'au point d'incision [398,399].

3.2. L'approche chirurgicale

Lorsque la plaque d'athérosclérose est trop importante pour une intervention endovasculaire, par exemple en présence d'un rétrécissement de la lumière de l'artère d'au moins 70 %, une approche chirurgicale est adoptée. Cette dernière consiste à retirer la plaque d'athérosclérose (endartériectomie) ou à contourner le vaisseau lésé (pontage).

L'endartériectomie consiste à ouvrir la paroi du vaisseau au niveau de la sténose afin d'exciser la plaque et de recoudre le vaisseau. Un stent est parfois posé en fin d'intervention afin de maintenir l'artère ouverte [400]. Elle est pratiquée sur les artères carotides, fémorales et aortiques, mais rarement sur les artères coronaires.

Le pontage vasculaire est principalement utilisé pour traiter les sténoses des artères coronaires et des jambes. La technique consiste à rediriger le flux sanguin en contournant le vaisseau sténosé à l'aide d'un greffon. Ce greffon peut être autologue en provenant d'un segment artériel ou veineux du patient, allologue en provenant d'une autre personne ou synthétique. Ce greffon est alors relié en amont et en aval de la sténose, suivi ou non de l'ablation de la partie sténosée.

V. Les stents

A. Définition et évolution du stent

Un stent est un dispositif endovasculaire, consistant en un fin tube expansible composé d'un alliage de métal ou de polymère biocompatibles, utilisé pour maintenir les vaisseaux ouverts afin de leur redonner une forme qui rétablit un flux sanguin normal.

Les stents en métal nu (*bare metal stent* : BMS) ont été développés et implantés pour la première fois en 1986 pour maintenir l'effet de l'angioplastie dans des artères coronaires occluses, c'est-à-dire maintenir le vaisseau ouvert après la dilation par un ballonnet [401–403]. Le déploiement du stent a permis une récupération instantanée du flux dans les artères.

Si l'angioplastie avec implantation de stent a réduit de manière significative les taux de morbidité et de mortalité des maladies cardiovasculaires, elle n'est pas exempte de complications, comme la resténose et la thrombose de stent (TS) [404] (**Figure 20**). La resténose est définie comme une hyperplasie néointimale qui obstrue à nouveau l'artère et limite l'efficacité des stents à plusieurs mois [402,403]. L'utilisation d'agents antiprolifératifs (paclitaxel et sirolimus), maintenus par un polymère sur les stents, a permis de réduire cette complication par une élution directe et locale de ces agents dans le vaisseau [402,403,405–407]. Ainsi, les premiers stents à élution médicamenteuse (DES) ont été approuvés par la FDA en 2003 [408]. Bien que leurs résultats soient encourageants, avec une réduction du risque de resténose passant de 25,5 % à 8,3 %, les DES ne diminuent pas la thrombose de stent [402,403,405–407]. Le développement des DES pour inhiber la resténose a ouvert la voie à l'évolution de stents possédant d'autres propriétés (antiinflammatoire, antithrombotique) ainsi qu'à de nouveaux polymères (voir section **V.B.3.**).

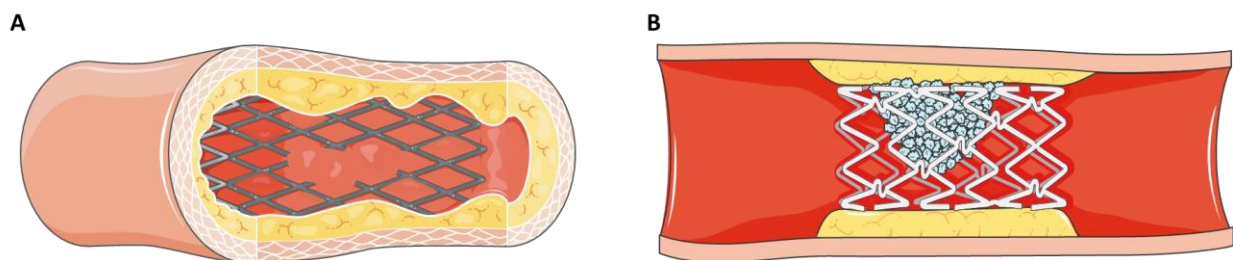


Figure 20 : Les principales complications de la pose d'un stent

Schématisation (A) d'une resténose de stent et (B) d'une thrombose de stent.

Une troisième génération de stents a récemment vu le jour : les stents biodégradables/biorésorbables. Ils ont pour objectif d'être un support mécanique temporaire pour les vaisseaux, en se dégradant au fil du temps, limitant ainsi les complications post-stenting [409–412]. Cependant, leur dégradation non contrôlée et non uniforme peut conduire à une défaillance structurale prématurée [409,411]. De plus, leurs propriétés mécaniques sont relativement éloignées du matériau de référence qu'est l'acier inoxydable 316L [409,411]. En effet, pour obtenir une même force radiale (force perpendiculaire exercée par le stent sur la paroi du vaisseau) qui permet de maintenir le vaisseau ouvert, les stents biodégradables/biorésorbables présentent des mailles plus épaisses, ce qui peut mener à des complications post-stenting [409–412]. Par ailleurs, les propriétés mécaniques évoluent au cours de la dégradation du stent et donc la force radiale diminue. Cette dernière est particulièrement cruciale pour limiter les perturbations locales du flux qui peuvent générer des flux potentiellement thrombogènes. Un stent biorésorbable a été lancé sur le marché avant d'être retiré en 2017 au vu du faible volume de ventes et d'un risque plus élevé de thrombose, même si ce dernier n'engendrait pas de surmortalité [413,414]. Par ailleurs, un essai clinique randomisé BIOADAPTOR RCT a présenté en 2023 des résultats encourageants concernant un stent biorésorbable à élution par rapport à un DES classique [415].

L'une des complications majeures d'une angioplastie avec pose d'un stent est la thrombose de stent (TS), dont l'incidence change en fonction du territoire vasculaire, mais dont la gravité est affirmée avec des taux de mortalité oscillant entre 10 et 40 % [416–420]. Il a été montré que la TS a deux déterminants majeurs : la nature thrombogène du vaisseau malade et la thrombogénicité intrinsèque du stent [404,421–423].

B. Caractéristiques thrombogènes des stents

Les deux principaux déterminants de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique sont le matériau et le design, tous deux ayant un impact sur l'adhérence et l'activation des plaquettes et pouvant également activer la voie de la coagulation et entraîner une thrombose [404,421,422].

1. L'importance du matériau

De nombreux matériaux ont été utilisés au fil des décennies pour fabriquer les stents, dont l'acier inoxydable, le tantale et les alliages de titane ou de cobalt. Il est à présent connu que le matériau composant le stent est une cause majeure d'adhérence et d'activation des plaquettes, et donc de thrombose. En effet, les surfaces artificielles peuvent adsorber les protéines plasmatiques, majoritairement le fibrinogène, et recruter à leur tour les cellules sanguines circulantes, principalement les plaquettes, pour déclencher la thrombose [421,424,425]. De plus, la surface du stent active la phase contact de la coagulation, conduisant à la génération de thrombine, l'agoniste plaquettaire le plus puissant. Elle renforce ainsi la croissance du thrombus et transforme le fibrinogène en fibrine insoluble pour stabiliser le caillot formé, empêchant ainsi le flux sanguin d'éliminer les plaquettes adhérentes [424].

L'acier inoxydable

L'acier inoxydable 316L, le premier matériau utilisé pour la fabrication des stents, a été choisi pour sa robustesse mécanique et sa résistance à la corrosion [422,426,427]. Il reste néanmoins peu flexible, ce qui peut entraîner une rupture du stent et des complications médicales [426]. De plus, l'acier inoxydable présente une radio-opacité basse et une très faible biocompatibilité, ce qui induit la formation de thrombi à la surface du métal [422,426–428]. En outre, de faibles quantités de nickel, de molybdène et de chrome sont libérées par la surface de l'acier inoxydable. Ces dernières peuvent déclencher des réponses immunitaires et inflammatoires d'hypersensibilité et d'allergie, libérant des chemokines et cytokines activant des plaquettes et des leucocytes susceptibles de renforcer la TS [422,429,430].

Les alliages titane et cobalt

Des alliages à base de titane et de cobalt ont été développés pour favoriser la biocompatibilité des stents. La formation spontanée d'un film d'oxyde sur ces matériaux induit l'adsorption naturelle d'albumine passivant la surface et empêchant la fixation de protéines plus thrombogènes (FW, fibrinogène) [431,432]. Les alliages à base de cobalt, tels que le cobalt-chrome et le platine-chrome, possèdent une résistance élevée à la corrosion et de

meilleures propriétés mécaniques que l'acier inoxydable. Ils permettent de fabriquer des mailles de stent plus fines, réduisant ainsi le recouvrement de la paroi du vaisseau et diminuant le risque de TS [422,426,433]. Cependant, comme dans le cas de l'acier inoxydable, des particules de nickel, de molybdène et de chrome peuvent migrer dans le sang avec le temps et produire des réactions immunogènes qui entraînent une réponse immunitaire et inflammatoire prothrombogène favorisant la TS [427,428,434]. Le nitinol, un alliage de nickel et de titane, présente l'avantage d'avoir une bonne mémoire de forme et une force d'expansion radiale élevée, ce qui est important pour une expansion optimale du stent [422].

Le tantale

Un autre métal utilisé pour la fabrication des stents est le tantale, qui possède une forte radio-opacité [422,434]. Sa surface s'oxyde après l'implantation et acquiert ainsi un niveau intéressant de biocompatibilité [427], contrairement à l'acier inoxydable ou aux alliages à base de titane et de cobalt. Cependant, le tantale manque de résistance radiale et se fracture facilement, ce qui peut entraîner diverses complications, notamment une TS [422,434].

La surface du matériau

Outre la nature du matériau, la qualité de surface est également importante. En effet, des études ont montré qu'une surface rugueuse est plus sujette à la thrombogénicité [404,435,436], c'est pourquoi il est essentiel d'utiliser des traitements de surface pour obtenir une surface lisse et exempte de contamination [428]. Divers traitements ont donc été mis au point, notamment l'(électro)polissage ou le décapage par ultrasons [428,437]. L'électropolissage possède plusieurs avantages qui en font la méthode de traitement de surface la plus utilisée. Elle peut être réalisée sur tout type de formes et complexité de surface, conduisant à une surface passivée, lisse, exempte de défauts et de contaminants [438]. Elle permet également l'élimination des inclusions non métalliques et des irrégularités liées à l'initiation de divers types de corrosion [438]. Le processus consiste à plonger le stent dans une solution électrolytique dans laquelle un courant électrique est appliqué [438,439]. Pour éviter l'oxydation et la détérioration du stent, une passivation de surface est réalisée après

électropolissage, suivie d'une désinfection avec de l'alcool isopropylique pour éviter la contamination microbienne à la surface du stent avant le séchage [440]. Il a été constaté dans des modèles animaux, chez le rat et chez le porc, que l'électropolissage des stents diminue la formation précoce de thrombi et réduit la resténose par rapport aux stents non polis [439]. Il existe également le polissage mécanique à l'aide d'un outil abrasif. Cependant, il a été montré que, bien que ce dernier rende la surface plus lisse, il n'est pas approprié pour le polissage des stents, car la couche d'oxyde à la surface du stent pauvre en titane et riche en nickel rend cette surface trop prompte à la corrosion [437].

En 2006, un brevet a été déposé pour le décapage des stents polymériques par ultrasons [441], néanmoins cette technique est peu utilisée. La surface du stent est tout d'abord mise en contact avec une première solution comprenant un solvant (exemple : acétone, chloroforme, DMSO) capable de dissoudre une partie de la surface du polymère. L'épaisseur décapée par les solvants dépend de la concentration de ce dernier, de son efficacité, mais aussi du temps d'exposition du stent au solvant. Une seconde solution, miscible avec le solvant, est mise en contact avec le stent pour éliminer la majorité du traitement de surface. Les dernières impuretés sont retirées par ultrasons. Le stent est alors plongé dans un bain d'une solution inerte pour le polymère (exemple : alcool isopropylique, eau). L'élimination des impuretés est obtenue en soumettant le bain à une cavitation ultrasonique, qui consiste en une formation de vides partiels dans un liquide. Les bains à ultrasons standards fonctionnent à une fréquence d'environ 40 kHz. Le nettoyage par ultrasons peut être suivi d'un rinçage et d'un séchage du stent à l'air ou au four.

2. L'importance du design

Le matériau utilisé pour fabriquer les stents n'est pas le seul déterminant important de la TS, car le design du stent peut également influencer l'activation des plaquettes adhérant aux mailles [428,434]. De nombreux paramètres doivent être pris en compte lors du design d'un stent, notamment la forme de la cellule, le nombre d'intersections entre les mailles, l'épaisseur des mailles et le nombre de couches (**Figure 21**).

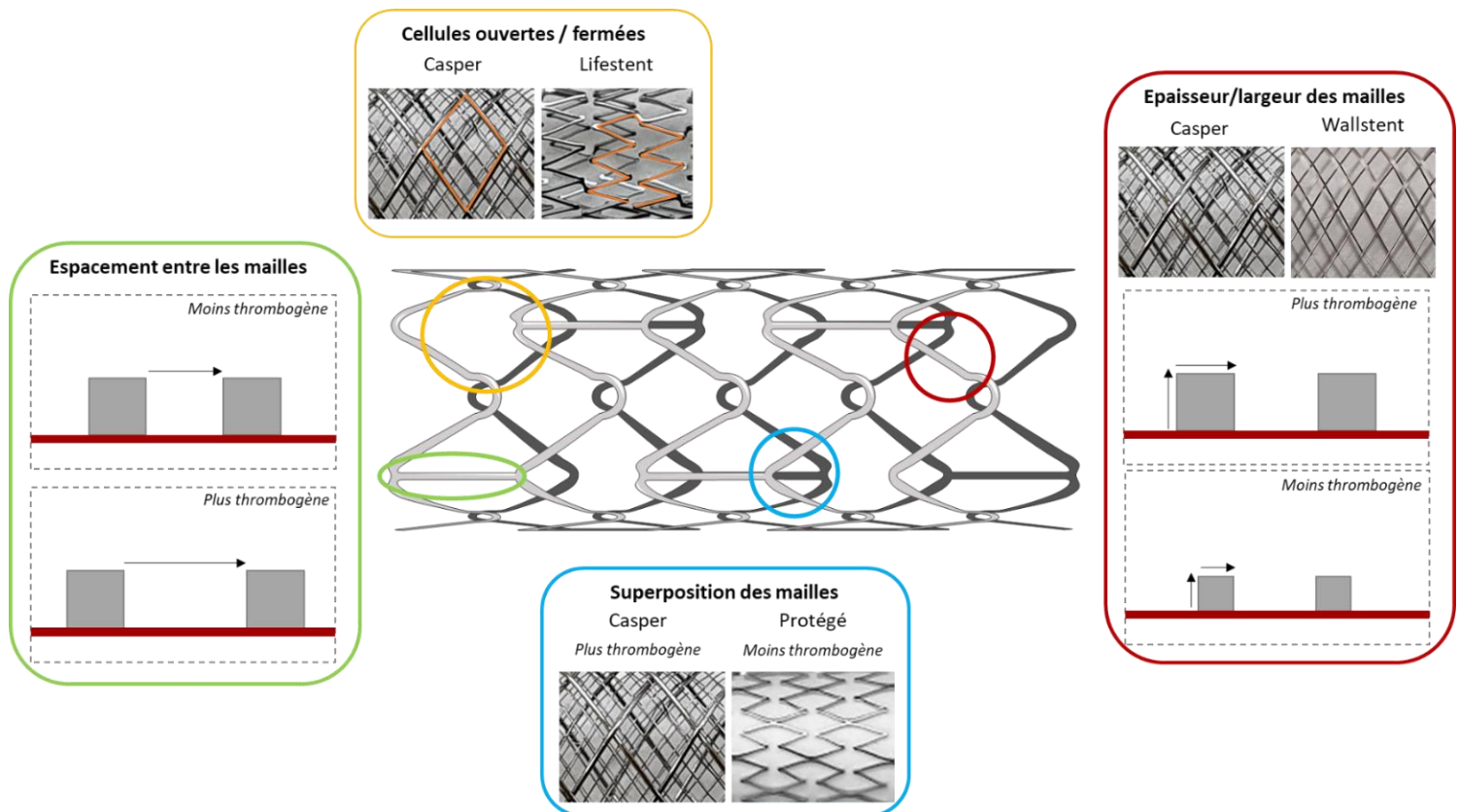


Figure 21 : Les principales caractéristiques thrombogènes des stents

D'après Gori *et al*, 2019 [419].

Les cellules des stents

Lorsqu'un stent est inséré dans un vaisseau qui change fortement de conformation (exemple : les artères fémorales ou poplitées qui peuvent se plier de manière importante), les cellules des stents peuvent changer de forme (cellules ouvertes) ou non (cellules fermées). Les cellules ouvertes s'élargissent lorsque le stent est plié [434]. Les cellules fermées sont associées à un risque plus faible de protrusion de la plaque d'athérosclérose, dont on sait qu'elle augmente le risque thromboembolique périprocédural. D'un autre côté, les mailles ouvertes présentent une meilleure flexibilité et une meilleure conformabilité dans les courbes et les vaisseaux tortueux. Néanmoins, la plupart des études n'ont pas démontré d'avantages cliniques significatifs d'un type par rapport à l'autre [442].

Les mailles des stents

Les stents utilisés en clinique ont des épaisseurs de maille très disparates. Il a été démontré qu'il existe un lien très étroit entre l'épaisseur des mailles et la performance du stent à maintenir un vaisseau ouvert. Il est donc possible d'améliorer les performances immédiates du stent en augmentant l'épaisseur des mailles, ce qui accroît la radio-opacité, la résistance radiale et le soutien de la paroi vasculaire [419,422,434]. Cependant, une épaisseur de maille excessive, telle qu'on la trouve dans les premiers stents développés, entraîne une densité métallique élevée, une moins bonne cicatrisation et, par conséquent, une incidence élevée de TS subaiguës [419,422,433,434,443]. Ces stents ont également été montrés pour être difficiles à utiliser et entraîner de fréquents échecs de déploiement et une embolisation distale du matériel de la plaque thrombotique [422,433,434]. De même que l'épaisseur est importante, la largeur des mailles ainsi que leur espacement jouent également un rôle dans l'hémodynamique. En effet, plus les mailles sont larges et/ou espacées, plus il y a de probabilités de contact entre les éléments sanguins (dont les plaquettes) et le matériau thrombogène [404,419]. Par ailleurs, l'espacement entre les mailles a aussi un rôle sur les taux de cisaillement à la paroi qui diminuent inversement à l'espacement qui augmente [419]. En effet, il a été montré dans des modèles numériques que la distance maximale entre les anneaux hélicoïdaux des stents doit être au moins égale à six fois l'épaisseur de la maille pour retrouver un flux laminaire dans les zones entre les mailles [444]. Enfin, la largeur des mailles est inversement corrélée à la cicatrisation du vaisseau, facteur responsable de TS [419].

La superposition de mailles

Les stents peuvent être mono ou bicouches. Il a été démontré que les stents bicouches réduisent de manière significative l'incidence des AVC périprocéduraux [445]. Cependant, la bicouche augmente la masse du corps étranger, la séparation du flux, la stagnation et l'adhérence cellulaire. Cela favorise le dépôt de plaquettes et l'activation de la coagulation favorisant la TS [421]. En accord avec cette hypothèse, plusieurs études rapportent un taux plus élevé de TS dans les stents bicouches par rapport aux stents monocouches, allant de 9 % à plus de 50 % [446–448].

3. L'importance du coating

La première génération de stents utilisés était des BMS, qui ont démontré leur efficacité face à l'angioplastie seule dans deux études cliniques [449,450]. Cependant, la complication majeure était la survenue de la resténose. Le développement de la deuxième génération de stents, les DES, a réduit les taux de resténose par l'utilisation de coating pour permettre une élution médicamenteuse antiproliférative la prévenant. Ainsi, outre le design et le matériau, le coating joue également un rôle dans la réduction de la thrombogénicité des stents ainsi que de la resténose, que ce soit par leur polymère ou par leur agent passif ou actif. Les stents coatés sont une classe particulière de stents, majoritairement retrouvés pour les stents coronaires. Les coating peuvent être regroupés en de nombreuses catégories, mais nous en retiendrons deux majeures : les coating passifs et les coating actifs [428,451,452].

Habituellement, les coating passifs servent uniquement de barrière entre le métal et la paroi vasculaire d'une part et la circulation sanguine d'autre part, tandis que les coating actifs interfèrent directement avec des processus biologiques (thrombose, prolifération intinale, inflammation), basés sur l'effet de composés thérapeutiques [451,452]. Les polymères, utilisés comme intermédiaires, sont nécessaires pour la plupart des agents, car ces derniers n'adhèrent pas correctement à la surface métallique du stent pour assurer une libération contrôlée de quantités suffisantes [452].

3.1. Les coating passifs

Les coating passifs sont divisés en composés inorganiques et organiques, considérés comme moins thrombogènes et inflammatoires, et donc potentiellement capables de réduire l'hyperplasie intinale, première cause de la resténose [428]. Les coating inorganiques comprennent les métaux, les semi-conducteurs, les composés carbone et les céramiques [428]. Les matériaux organiques tels que les polymères biostables, biodégradables et certains polymères biologiques sont utilisés comme coating de stents ou comme véhicules pour le coating de médicaments [428]. L'héparine, un coating biologique, est utilisée à la fois comme un coating passif et un coating actif [428].

3.1.1. Les coating inorganiques

En général, les coating inorganiques présentent un degré élevé d'inertie (donc une stabilité chimique), ainsi qu'une bonne stabilité mécanique. Cette stabilité leur permet de servir principalement de coating hémocompatible passif et d'inhibiteur de corrosion. Les coating inorganiques les plus couramment utilisés pour les stents sont l'or, le carbure de silicium, les composés de carbone ou encore l'oxyde de nitrure de titane [428].

L'or

L'or est un matériau chimiquement inerte, radio-opaque et anticorrosif qui permet un déploiement facile du stent [428]. Bien que ce type de coating ait montré un effet sur l'inhibition de la prolifération néointimale chez le cochon, les essais cliniques chez l'Homme ont indiqué que la resténose de ces stents était équivalente à celle des BMS, probablement parce que l'or déclenche une réponse vasculaire augmentant le risque de resténose par une allergie de contact à l'or entraînant une réaction inflammatoire [404,452–455]. En effet, ce métal ne forme pas de couche oxyde protectrice. Or, il a été démontré que les matériaux qui ne supportent pas l'oxydation présentent une adsorption plus importante (car moins biocompatible) des protéines plasmatiques réactives telles que le fibrinogène favorisant l'adhérence et l'activation des plaquettes, ce qui peut entraîner une TS [453,456,457]. Ainsi l'or n'est plus considéré comme un coating intéressant pour les stents.

Le carbure de silicium

Le carbure de silicium (SiC) est un semi-conducteur amorphe, riche en hydrogène, qui pourrait être moins thrombogène et inflammatoire que les BMS [458]. Des études *in vitro* sur des stents coatés de SiC ont montré une réduction importante de la formation de fibrine et de thrombi, ainsi qu'une réduction de l'activation plaquettaire et leucocytaire [459]. Cependant, bien que des études chez l'Homme avec des stents coatés de SiC aient montré moins de thromboses aiguës que les BMS, elles n'ont pas rapporté d'effet significatif sur l'hyperplasie intimale [460–462]. Une nouvelle génération de stents coatés au SiC testée sur un petit groupe de patients n'a pas donné de résultats concluants puisqu'elle était associée à un risque plus élevé de revascularisations répétées sans avantage en termes de sécurité [404,463].

Le carbone diamanté

Le carbone diamanté est un matériau à base de carbone chimiquement inerte qui présente une meilleure biocompatibilité [464]. Les stents coatés de carbone diamanté ont montré une diminution de l'hyperplasie intimale et de la resténose chez le porc [465]. Cependant, les résultats sont mitigés. En effet, deux essais cliniques réalisés chez des patients à risque ont montré que ce type de stent peut réduire de manière significative la TS et la resténose [466,467], mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études cliniques [428,451,452]. Ce coating est donc toujours en cours d'évaluation, notamment en association avec d'autres composés (calcium, phosphore).

Le nitrure de titane

Le nitrure de titane (TiNOX) agit comme une barrière pour les ions métalliques et fait preuve d'une grande biocompatibilité. Il a été montré dans une étude sur le porc, que ce type de coating de stent a permis de réduire la thrombose dans le stent et la prolifération néointimale, ce qui a été confirmé en essais cliniques [468,469]. Une étude comparative en 2010 a montré avec un recul de cinq ans que les stents en TiNOX présentaient moins d'évènements indésirables majeurs, pas de TS et un taux inférieur de recanalisation par rapport au groupe témoin de même design, sans TiNOX [470]. Cependant, ils ne présentent pas d'avantages par rapport aux DES [471]. D'autres études cliniques sont donc à mener pour plus de certitudes sur l'efficacité de ce type de coating.

3.1.2. Les coating organiques

Les substrats organiques permettent de modifier chimiquement les surfaces des stents plus facilement que les substrats inorganiques. Néanmoins, ils sont également plus sujets aux altérations et à la dégradation dans l'environnement biologique. Une variété de polymères biostables, de polymères biodégradables et de matériaux biologiques sont utilisés comme coating organiques passifs pour les stents [428].

Les polymères biodégradables

Les polymères biodégradables possèdent de bonnes propriétés mécaniques et biocompatibles. On y trouve notamment le polyéthylène téréphtalate (PETP), le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le polyester (Dacron), le parylène et le polyuréthane (PU) amphiphile. Ces matériaux réduisent la resténose avec plus ou moins de succès [428,472,473]. Cependant, plusieurs coating polymères ont été associés à une inflammation et à une augmentation de la formation néointimale dans des études animales, augmentant le risque de TS tardive [473,474]. Les polymères biodégradables ont également montré une bonne stabilité mécanique et une compatibilité sanguine acceptable. Néanmoins, des polymères tels que l'acide polyglycolique (PGA), l'acide poly-L-lactique (PLA) et le polycaprolactone (PCL) ont entraîné une inflammation importante et une prolifération néointimale accrue dans une artère porcine durant sa dégradation [475,476]. Concernant les stents recouverts de poly-bis-trifluoro-éthoxyphosphazène (PTFEP), ils présentent une bonne biocompatibilité dans un modèle porcin jusqu'à six mois, avec une récupération endothéliale complète à cinq jours [473,477]. Les polyéthylènes, PU, PGA et PLA ont été évalués en tant que matériaux de coating de stent avec de bons résultats et sont déjà utilisés dans d'autres dispositifs médicaux (matériau pour des greffes ou de sutures) [478,479]. D'autres coating comme le Dacron, le PCL ou le PTFEP nécessitent plus d'études à long terme.

Les polymères biocompatibles durables

Une variété de polymères biocompatibles tels que la phosphorylcholine (PC), l'acide hyaluronique, la fibrine et l'héparine sont utilisés comme coating organiques passifs pour les stents. Ces coating cherchent à obtenir une surface qui réduit les réactions tissulaires indésirables ou imiter un substrat biologique qui peut faciliter la cicatrisation autour du site d'implantation du stent [428]. La PC est un polymère phospholipidique neutre, zwitterionique et naturel [434]. C'est un composant majeur de la couche externe de la membrane plasmique des GR. Il a été démontré que les stents coatés de PC entraînent une réduction de l'activation plaquettaire et de la formation de thrombi. Ils sont donc non-inflammatoires et non-thrombogènes *in vitro* et *in vivo*. Cependant, bien que des études cliniques aient montré que ce type de coating est à la fois sûr et efficace dans le traitement de la resténose et la prévention de la TS, il n'a pas fourni de meilleurs résultats que les BMS [451,480,481] à

court terme et n'a pas été évalué à long terme [482]. L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire, glycosaminoglycane non sulfaté, composant de la MEC. Bien que les stents coatés d'acide hyaluronique semblent prometteurs, car ils ont permis de réduire la thrombose et la resténose chez des modèles de singes et de porcs [460,483], des études supplémentaires sur leur efficacité chez l'Homme doivent être menées. La fibrine est une protéine insoluble produite lors de la coagulation. Les stents coatés par de la fibrine exogène présentent moins d'occlusions des vaisseaux et de réactions immunologiques que les polymères PU et PETP [484]. Comparés à des BMS non coatés, les stents coatés à la fibrine permettent une meilleure endothélialisation [485]. De plus, ils ne présentent pas de resténose, ni de TS à 28 jours dans un modèle porcin [486], mais des études cliniques chez l'Homme doivent encore être menées. L'héparine est un polysaccharide linéaire, glycosaminoglycane sulfaté, connue pour ses propriétés anticoagulantes. Principalement évaluée en tant que coating passif, elle a également été étudiée en tant que coating actif sur des DES. Les stents coatés à l'héparine ont présenté des taux réduits de thrombose subaiguë et d'hyperplasie intimale par rapport aux BMS dans les études animales [487,488]. Néanmoins, les essais cliniques comparant les stents recouverts d'héparine aux stents non recouverts n'ont pas montré d'impact significatif sur la TS et la resténose [489–491].

Bien que ces polymères favorisent la réendothélialisation et présentent moins de réactions inflammatoires dans les études animales, les essais chez l'Homme n'ont pas montré de différences significatives par rapport aux résultats obtenus avec les BMS.

3.2. Les coating actifs

L'incapacité à délivrer une concentration suffisante de médicament sur le site de la lésion par voie systémique a nécessité le développement d'une nouvelle solution pour prévenir la resténose, les DES. Les mailles de ces stents contiennent un coating actif, basé sur l'effet de composés thérapeutiques soit chimiquement liés à la surface du stent, soit piégés dans un polymère tridimensionnel qui fonctionne tel un réservoir. Ils libèrent un agent bioactif localement et à haute concentration dans le sang et dans la paroi artérielle afin de réduire considérablement les taux de resténose, sans effets systémiques indésirables. On peut distinguer plusieurs types de DES : à visée de cicatrisation, antithrombotiques, antiinflammatoires ou antiprolifératifs.

La plupart des agents pharmaceutiques libérés par les DES sont mélangés à des polymères synthétiques qui agissent comme des vecteurs de médicaments et éluent l'agent actif au fil du temps [436]. Malheureusement, nombre de ces DES enrobés de polymères induisent des réactions indésirables marquées chez les animaux et les humains, comme des réactions inflammatoires [436,472,473]. De plus, ils retardent la réendothélialisation et sont considérés comme un facteur important de TS tardive qui peut entraîner un IM et la mort [492,493]. Par ailleurs, l'incidence de la TS tardive est signalée comme étant plus élevée avec les DES à base de polymères qu'avec les BMS, en particulier après l'arrêt de la bithérapie antiplaquettaire [474,494,495].

3.2.1. Les agents antiprolifératifs

Les plus connus et les plus utilisés des agents antiprolifératifs sont les limus, des immunosuppresseurs. Ce sont des molécules possédant des propriétés antibiotiques qui interfèrent dans le cycle cellulaire. Le premier d'entre eux, le sirolimus (ou rapamycine), déjà utilisé dans les greffes pour éviter les rejets, inhibe la protéine mTOR et bloque le cycle cellulaire des CML et des lymphocytes B et T [406,496]. Le paclitaxel, initialement utilisé lors de chimiothérapies, inhibe la dépolymérisation des microtubules impliqués dans la mitose, pour aboutir à la mort cellulaire des CML en inhibant leur division [472]. Ces deux agents impactent également d'autres cellules telles que celles de l'endothélium et induisent une expression du FT, un élément-clé de l'initiation de la coagulation et de la formation d'un thrombus [497,498]. Ainsi ils jouent probablement un rôle dans la TS tardive retrouvée dans les DES. Le zotarolimus, un dérivé du sirolimus, a été mis au point spécialement pour les DES. Il garde le même mode d'action que le sirolimus, mais possède une diffusion plus lente [499]. L'éverolimus est un dérivé synthétique du sirolimus, également utilisé lors de transplantations. Il possède également la même activité biologique que son prédécesseur, mais il est plus lipophile, ce qui facilite son passage à travers les membranes cellulaires et permet une meilleure diffusion dans la paroi vasculaire [434]. Enfin, le tacrolimus, également utilisé dans la prévention des rejets de greffe, agit comme inhibiteur de la calcineurine, une protéine stimulant des facteurs de transcription. Il limite donc l'activation et le recrutement de macrophages et des lymphocytes, ainsi que la prolifération des CML et donc la resténose [500].

3.2.2. Les agents antithrombotiques et antiinflammatoires

Plusieurs agents antithrombotiques ont été ou sont en cours d'évaluations cliniques. Bien que principalement évaluée en tant que coating passif, l'héparine a également été étudiée en tant que coating actif sur un DES. Il n'a cependant été noté aucune différence dans la survenue de TS subaiguë, d'évènements indésirables majeurs ou de taux de resténose à six mois lors d'un essai clinique [489] et le développement de ce type de coating n'a pas été poursuivi. Par ailleurs, les résultats précliniques d'un stent coaté d'hirudine recombinante ou d'iloprost, un analogue de la prostaglandine I₂, ont été encourageants en montrant une réduction de la concentration locale de thrombine ainsi qu'une plus faible resténose [501–503], mais aucun essai clinique n'a été réalisé.

D'un autre côté, la réduction de l'inflammation locale post-stenting est souhaitable, du fait de son association avec la thrombose et la resténose. La dexaméthasone, un corticostéroïde, a conduit à des résultats prometteurs dans des essais cliniques en réduisant le taux de resténose chez les patients à plus ou moins long terme [504–506], au contraire du batimastat, un inhibiteur de métalloprotéinase antimigratoire [507]. La dexaméthasone ne semble toutefois plus être utilisée dans le développement de stents. Un stent coaté à l'abciximab, un agent pharmacologique empêchant l'agrégation plaquettaire, mais liant aussi Mac-1 (CD11b/CD18) présent sur les macrophages/monocytes [508], a également été évalué pour ses effets antiinflammatoires chez le porc. Il n'a cependant pas montré d'amélioration sur l'infiltration de cellules inflammatoires et sur l'hyperplasie intimale par rapport à des DES au sirolimus ou au paclitaxel [509]. Par ailleurs, diverses études cliniques ont montré que, bien que les stents coatés à l'abciximab soient sûrs et entraînent une réduction de la resténose et de la TS, il n'y a pas de différence significative avec les BMS témoins [510,511]. L'œstradiol est un œstrogène qui réduit les taux de fibrinogène et de PAI-1 augmentant peut-être les capacités de fibrinolyse. Il a également des propriétés antiinflammatoires et permet une réendothélialisation rapide. Des études cliniques basées sur ce coating ont montré que, bien qu'il induise un faible taux de resténose et pas de TS, il ne présente pas de bénéfices supérieurs aux BMS, comme déjà montré chez les animaux [512–514].

3.2.3. Les agents cicatriciels

Les dommages aux CE et à la couche intimale de la paroi des vaisseaux sanguins sont à la base de la thrombose et de l'hyperplasie néointimale [472]. L'endothélialisation des surfaces des stents vasculaires est une approche biologique alternative dans laquelle des CE génétiquement modifiées sontensemencées sur le stent avant l'implantation pour fournir une enveloppe protectrice naturelle qui, à son tour, inhibe la thrombose et l'hyperplasie intimale [404,515]. Cependant, des études *in vitro* ont indiqué un rétrécissement des artères dû à la perte immédiate des cellulesensemencées, aux lésions des CE lors de l'expansion du ballonnet et à l'incapacité de maintenir l'adhérence des cellules à la paroi vasculaire sous un flux pulsatile [516,517]. Par ailleurs, plusieurs tentatives de coating de CE sur des greffons médicaux ont été réalisées, mais toutes ont échoué jusqu'à présent [478].

Les études se sont alors concentrées sur l'utilisation d'agents bioactifs, tels que l'anticorps anti-CD34, une glycoprotéine exprimée par les cellules progénitrices, et les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF) pour améliorer la réendothélialisation. Ces agents cicatrisants sont délivrés localement par élution à partir de coating, d'immobilisation de surface ou à travers des cathéters à ballon poreux [508,518–525]. Les anti-CD34 assurent une réendothélialisation plus précoce à plus ou moins long terme en permettant la capture de cellules progénitrices endothéliales CD34 positives circulantes chez le porc et l'Homme [526–528], mais le taux de resténose reste élevé dans un essai clinique [527]. D'autres études sont donc à mener pour s'assurer de l'efficacité de ce coating. Les VEGF ont été intégrés aux stents dès les années 1990 [529]. Cependant, des résultats incohérents concernant la réendothélialisation et l'inhibition de la resténose ont été obtenus dans les études animales. Ils pourraient être dus aux différentes méthodes de préparation des stents coatés aux VEGF. Tandis que certaines études chez le lapin et le porc indiquent que les coating à base de VEGF accélèrent la réendothélialisation, d'autres constatent l'opposé et une réduction de la TS [530–532]. Les stents coatés aux VEGF sont donc prometteurs pour la régénération endothéliale, mais les données cliniques ne sont pas suffisantes pour le moment.

C. Modèles pour étudier la thrombogénicité des stents

Une compréhension approfondie des propriétés thrombogènes des stents est essentielle pour développer des stents plus biocompatibles. C'est pourquoi des modèles expérimentaux ont été conçus pour étudier les mécanismes par lesquels les stents utilisés en clinique favorisent l'adhérence plaquettaire, l'activation de la coagulation et la thrombose. Les principaux outils développés au cours des dernières décennies sont décrits ci-dessous (Figure 22).

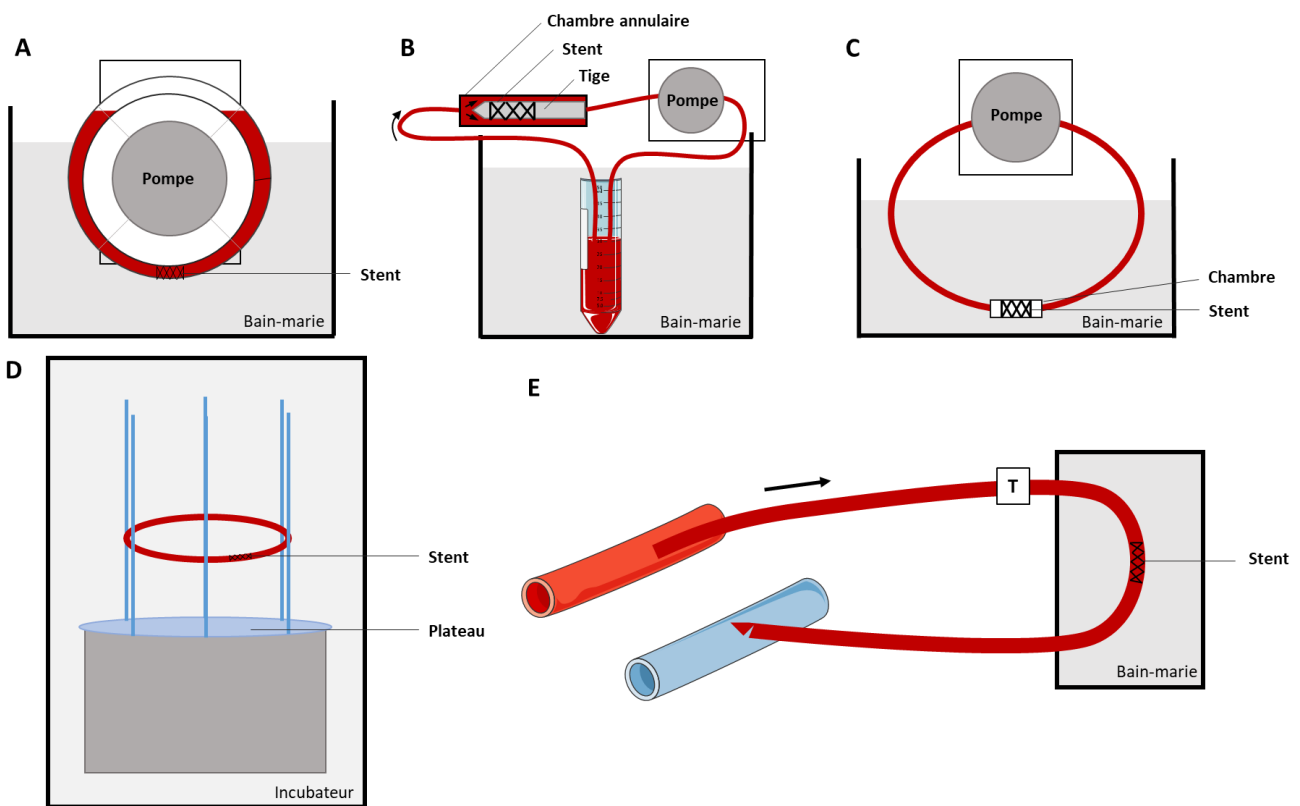


Figure 22 : Les principaux outils pour évaluer la thrombogénicité des stents

(A) La Chandler Loop. (B) La chambre de perfusion annulaire. (C) Le système de perfusion de paillasse circulaire. (D) Le système Haemobile. (E) Le modèle de perfusion *ex vivo* par shunt artério-veineux carotide-jugulaire. T : transducteur (T). Adapté de Kern & Mangin, 2023 [533].

1. Le système Chandler Loop

Le système Chandler Loop (SCL) a été développé par Chandler dans les années 1950s [534]. Tout d'abord mis en place pour produire des thrombi artificiels, ce dispositif a été adapté pour étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents. La première version est composée d'une pompe péristaltique et d'un système circulaire fermé constitué de tubes en chlorure de polyvinyle (PVC). Ce dernier tourne sur un plan incliné à 23° pour induire la circulation de sang total non anticoagulé. L'une des versions les plus fréquemment utilisées consiste en une boucle de tubes assurant une circulation sanguine passive par rotation de la boucle sur elle-même [535]. Dans d'autres SCL, le sang circule activement par une rotation discontinue qui permet de reproduire partiellement un flux pulsatile dans le tube [536,537]. Les SCL sont conçus pour insérer un stent coronaire à l'intérieur de la tubulure, qui est ensuite maintenue à une température physiologique de 37°C dans un bain-marie ou un incubateur. De nombreux autres ajustements sont possibles, notamment l'utilisation de matériaux différents pour les tubulures, tels que le silicone, le Tygon ou le PVC, enduits ou non d'héparine. Les tubes peuvent avoir des diamètres variables (3-7 mm), ce qui permet de tester différents types de stents. Le SCL est compatible avec l'utilisation de sang total ou de plasma riche en plaquettes (PRP) et de produits sanguins de différentes espèces (humaine, porcine) anticoagulés avec du citrate de sodium ou de l'héparine [535–541]. Un avantage du SCL est qu'il permet de combiner plusieurs boucles et donc d'évaluer plusieurs conditions simultanément [537]. Un autre avantage de l'une des versions modifiées réside dans le fait que le sang circule passivement par rotation de la boucle elle-même, ce qui évite l'effet traumatisant d'un système de pompage actif [536,540,541]. Une limite des SCL, du moins tels qu'ils sont classiquement utilisés, est qu'ils ne permettent pas l'insertion d'une chambre reproduisant la géométrie des vaisseaux humains et donc l'utilisation de conditions physiopathologiques rencontrées chez les patients lorsqu'ils sont stentés (rétrécissement du vaisseau, présence d'une plaque d'athérosclérose, taux de cisaillement à la paroi). En outre, le remplissage partiel de la boucle crée une interface air/sang importante qui peut entraîner la dénaturation des protéines et l'activation des cellules sanguines, et donc induire des artefacts majeurs.

Le SCL a surtout été utilisé pour étudier l'impact du traitement de surface et du coating sur la thrombogénicité intrinsèque des stents. Il a permis de montrer que les modifications

mécaniques et chimiques de la surface du stent peuvent réduire sa thrombogénicité [535,540]. En effet, les stents (électro)polis présentent une nette réduction de la formation de thrombi par rapport à des stents identiques, mais non (électro)polis [535,540]. Ce modèle a également démontré que le coating peut jouer un rôle important dans la diminution de la thrombogénicité du stent [535–539]. Le SCL a également montré que les DES, notamment ceux recouverts d'agents antiprolifératifs tels que le sirolimus, ne favorisent pas la thrombose par rapport aux BMS [541].

2. La chambre de perfusion annulaire

La chambre de perfusion annulaire (CPA) a été mise au point par Sakariassen *et al.* dans les années 1980s pour étudier l'interaction des plaquettes avec des CE humaines cultivées dans des conditions de taux de cisaillement définis [542]. Le modèle original est un système ouvert composé d'un tube en élastomère de silicone de 3 mm de diamètre relié à une chambre en polyméthacrylate de méthyle dans laquelle circule à des débits compris entre 50 et 150 mL/min du sang humain reconstitué et anticoagulé par du citrate. Ce modèle a ensuite été adapté par Zafar *et al.* pour étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents [425]. Le système a été modifié pour devenir une boucle fermée contenant une pompe péristaltique, où le stent est placé sur une tige interne. Le système est maintenu à 37°C en immergeant le réservoir de sang dans un bain-marie. La conception cylindrique de la chambre de Zafar a pour avantage qu'elle permet de tester les stents dans un flux sanguin laminaire. Cependant, le modèle présente des limites, notamment parce qu'il ne reproduit pas la géométrie des artères coronaires, faisant que l'implantation du stent et la rhéologie locale diffèrent de la situation clinique. En outre, une autre limitation majeure réside dans le fait que le sang est en contact avec la face externe et non la face interne du stent, alors que chez les patients, c'est la face interne qui est exposée au sang et la face externe est en contact avec la paroi de l'artère malade.

Bien que la CPA n'ait pas été beaucoup utilisée, elle a toutefois permis de démontrer que le coating du stent peut réduire sa thrombogénicité. Cela a notamment été décrit dans une étude où des DES coatés par électret (matériau chargé négativement) présentent une thrombogénicité plus faible que les BMS ou les DES classiques [425].

3. Le système de perfusion circulaire de paillasse

Le système de perfusion circulaire de paillasse (PCP) a été mis au point par Beythien *et al.* dans les années 1980s pour tester la thrombogénicité des stents coronaires [543]. Le modèle PCP original consiste en un système fermé contenant une pompe péristaltique pour perfuser du sang ou du plasma à des débits constants à travers un tube en silicone de 4 mm de diamètre. Ce système permet d'insérer un stent à l'intérieur du tube et de le maintenir à une température physiologique de 37°C par immersion dans un bain-marie. Le modèle PCP a subi diverses modifications dans ses versions ultérieures [464,544–549], notamment : i) l'utilisation de matériaux variés pour les tubes, comme le silicone ou le PVC, qui présentent divers diamètres (3-4 mm) et permettent de tester différents types de stents, ii) l'insertion d'une chambre d'écoulement en silicone dédiée reproduisant des géométries de vaisseaux complexes telles que la bifurcation, ou iii) l'utilisation de différentes pompes, dont des pompes péristaltiques ou pulsatiles, assurant une grande variété de débits allant de 8 mL/min à 200 mL/min. Il faut néanmoins noter que les investigateurs n'ont généralement pas pris soin d'essayer d'approcher les conditions hémodynamiques physiologiques rencontrées dans les artères coronaires (autour de 60 mL/min) [550]. Plusieurs versions dérivées du modèle PCP original ont été développées au cours des années, par exemple celle de Gasior *et al.* qui diffère du dispositif décrit ci-dessus par l'insertion d'une chambre mimant la bifurcation de la coronaire principale gauche et présentant une forme de Y [551]. Le système PCP est compatible avec l'utilisation de sang total ou de PRP provenant de différentes espèces (humaine, porcine). Selon les études, les investigateurs ont utilisé divers anticoagulants (acide-citrate-dextrose, citrate de sodium, héparine). L'un des principaux avantages du modèle PCP est sa simplicité d'utilisation, permettant de combiner deux systèmes et donc de tester plusieurs conditions à la fois. Toutefois, les chambres utilisées ne reproduisent pas les dimensions ni la géométrie des vaisseaux dans lesquels les stents sont implantés, ignorant donc la part de la rhéologie et de la perturbation du flux dans le rôle de la thrombogénicité des stents.

Les modèles PCP ont contribué à améliorer notre compréhension de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. Tout d'abord, ils ont mis en évidence l'impact de la structure du stent sur sa thrombogénicité. En effet, ces modèles ont apporté la preuve que des stents spécialisés avec des géométries spécifiques, notamment

ceux adaptés à une bifurcation, réduisent la formation d'un thrombus [551]. En outre, les modèles PCP ont contribué à montrer que le design du stent est également un paramètre clé : l'épaisseur et/ou le nombre de mailles jouant un rôle important dans la thrombogénicité du stent [544,545,548,551]. Ces dispositifs *in vitro* ont en outre révélé que certains matériaux utilisés pour fabriquer les stents sont thrombogènes, notamment le tantale, l'acier inoxydable et les alliages platine-chrome [543,548,549]. Ils ont également dévoilé que certains polymères utilisés pour coater les stents, en particulier le polyfluorure de vinylidène-co-hexafluoropropène (PVDF-HFP), présentent un profil pro- plutôt qu'anti-thrombogène [549]. D'autre part, les modèles PCP ont fourni des preuves importantes que certains coating représentent une option intéressante pour réduire la thrombogénicité des stents. Cela a notamment été démontré pour l'albumine, l'héparine ou un coating de carbone diamanté par rapport aux BMS [464,546]. Enfin, les dispositifs PCP ont été utilisés pour obtenir des preuves que la technique de pose de stent, telle que les méthodes de *double kissing crush* ou *T and small protrusion*, n'a pas d'impact significatif sur la thrombogénicité du stent dans un modèle de bifurcation coronaire [547].

4. Le système de perfusion Haemobile

Le système de perfusion Haemobile (SPH) a été développé par Engels *et al.* au milieu des années 2010s [552]. Le système se compose d'un moteur sur lequel un plateau est monté pour fixer la boucle de tube PVC de 3 mm de diamètre, à travers laquelle du sang total humain hépariné est perfusé. Les stents sont insérés dans le tube et le système maintenu à 37°C dans un incubateur. Le sang à l'intérieur de la boucle est d'abord accéléré avant d'être décéléré jusqu'à l'arrêt à la position de départ et la répétition de ce processus génère un flux pulsatile dans la boucle. L'avantage du SPH est l'utilisation d'un moteur rotatif, qui permet de générer des débits pertinents, reproduisant des conditions hémodynamiques similaires à celles trouvées dans les artères coronaires [553]. Cependant, le tube utilisé pour former la boucle fermée ne permet pas l'insertion d'une chambre d'écoulement, ce qui limite le système aux stents droits de géométrie simple et d'un diamètre correspondant au tube.

Le SPH n'a pas été beaucoup utilisé dans le domaine de l'évaluation des stents. Il a néanmoins permis de confirmer la thrombogénicité de différents matériaux de stent et de

montrer que le coating du stent peut jouer un rôle dans la réduction de la thrombogénicité intrinsèque du stent [552,554].

5. Le modèle de perfusion *ex vivo* par shunt artério-veineux carotide-jugulaire

Outre les modèles classiques *in vitro*, des systèmes *ex vivo* ont également été conçus pour étudier la thrombogénicité des stents. Ces approches sont basées sur l'utilisation de shunts artério-veineux (SAV) dans des modèles animaux et chez l'Homme. Dans la version originale, développée pour simplifier la procédure d'hémodialyse continue chez les patients souffrant d'insuffisance rénale aiguë, l'artère radiale et une veine de l'avant-bras d'un volontaire humain sont reliées par un tube en téflon de 1/8 de pouce (environ 3,2 mm) [555]. D'autres versions du modèle de SAV ont été développées pour étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents chez différentes espèces, notamment le porc, le rat et le chien [432,488,556–562]. Le système de SAV permet l'insertion d'un stent dans la tubulure, qui est ensuite maintenue à 37°C par immersion dans un bain-marie [556–558,561]. Un transducteur ultrasonique est utilisé pour surveiller le flux sanguin et donc la formation de thrombus dans le système [556–558,561]. Cette surveillance est particulièrement importante pour arrêter l'expérience lorsque le débit devient trop lent. Le modèle expérimental original a subi de nombreuses modifications, notamment l'utilisation de divers matériaux pour les tubes, qui présentent des diamètres variables (entre 2 et 3 mm) et permettent de tester différents types de stents. Un avantage du modèle de SAV est que plusieurs tubes peuvent être connectés en parallèle pour tester simultanément diverses conditions. D'autres versions du modèle permettent d'insérer une chambre d'écoulement ayant la géométrie de l'artère d'intérêt. De plus, l'utilisation d'animaux vivants présente un avantage majeur par rapport aux systèmes *in vitro*, car ils reproduisent mieux les conditions physiologiques avec l'activation de la coagulation.

Les divers modèles de SAV ont joué un rôle important dans l'identification des facteurs responsables de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. Ils ont montré que la composition du stent joue un rôle important dans la thrombogénicité aiguë des stents [432,556–559]. Les modèles de SAV ont aussi contribué à montrer qu'un stent résorbable en magnésium est moins thrombogène qu'un stent en acier inoxydable 316L, à géométrie et

design équivalents. Ces modèles ont également montré que les stents en acier inoxydable coatés d'héparine sont moins thrombogènes que les stents en acier inoxydable nus [488]. De même, ils ont prouvé que le traitement de surface des stents affecte leur thrombogénicité, car le poids total du caillot formé sur les stents polis est significativement inférieur à celui formé sur les stents non polis [560]. Enfin, les systèmes de SAV ont mis en évidence que la technique de stenting dans une bifurcation coronaire a un impact sur la thrombogénicité intrinsèque des stents. Ainsi, la technique du *double kissing crush* génère plus de thrombi sur les stents au niveau de la bifurcation, alors que la technique du *double kissing culotte* conduit à plus de thrombi sur les stents dans branche principale proximale [561,562].

VI. La thrombose de stent

A. Définition

La complication la plus fréquente et la plus grave de l'angioplastie avec pose de stent est la thrombose de stent (TS), qui présente un taux de décès très élevé [563,564]. Elle consiste en la formation d'un thrombus à la surface d'un stent implanté dans un vaisseau malade présentant une plaque d'athérosclérose. Les thrombi sur les stents sont principalement composés de plaquettes, mais ils contiennent également des GR, des leucocytes et des protéines plasmatiques solubles, dont du FW, du fibrinogène et de la fibrine [424]. Ce thrombus peut devenir occlusif et bloquer le vaisseau sanguin, conduisant à une nouvelle pathologie ischémique grave [404].

Différentes catégories de TS ont été définies par le consortium de recherche académique (ARC) en 2007 selon la chronologie d'apparition de la complication : la TS aiguë (dans les 24 heures), la TS subaiguë (dans les 30 jours), la TS tardive (dans l'année) et la TS très tardive (plus d'un an après la pose d'un stent). Les TS aiguës et subaiguës sont souvent regroupées sous le terme de TS précoce (**Table 1**).

Catégorie de TS	Temps d'apparition
Aiguë	0 – 24 heures
Subaiguë	1 – 30 jours
Tardive	1 – 12 mois
Très tardive	> 1 an

Table 1 : Les différentes catégories de thrombose de stent

TS : thrombose de stent.

L'ARC catégorise également la TS selon le scénario clinique. Ainsi, en fonction du diagnostic, elle peut être classifiée en certaine, probable ou possible. Une TS est dite certaine après confirmation à l'angiographie de la présence d'un thrombus, soit directement sur le

stent, soit dans les 5 mm en amont ou en aval des extrémités du stent. Une TS probable est définie comme tout décès inexpliqué dans les trente jours suivant la pose du stent. Quant à la TS possible, elle est proposée lors d'un décès inexpliqué qui survient plus de trente jours après la pose du stent [416,565].

B. Épidémiologie

L'incidence de la TS dans les coronaires a été considérablement réduite grâce à l'usage d'agents antiplaquettaires, passant de 24 % dans les années 1990 à moins de 1 % aujourd'hui [416,566]. Le taux de TS est plus faible pour les interventions percutanées non urgentes (0,3 à 0,5 %), mais peut atteindre 3,4 % pour les syndromes coronariens aigus [416]. La TS reste toutefois particulièrement délétère pour les patients, puisqu'elle présente un taux de mortalité oscillant entre 10 et 40 % [416–420] et un taux de récurrence de 15 à 20 % à cinq ans [419,567].

La majorité des événements de TS apparaissent dans les premiers jours suivant l'implantation du stent [564,568,569]. Le délai d'apparition des TS entre BMS et DES est différent, puisque les TS précoces semblent être plus fréquentes pour les BMS et les TS tardives plus fréquentes pour les DES [416,418]. Cependant, ces résultats ne font pas consensus puisque d'autres articles indiquent qu'il n'y a pas de différence de temps d'apparition de la TS entre BMS et DES [423,563].

C. Étiologie

De nombreux facteurs peuvent être responsables de la survenue d'une TS. La lésion vasculaire, la perturbation endothéliale et le retard de cicatrisation liés aux DES sont des causes « classiques » de la TS. Une hypercoagulabilité et un traitement antiplaquettaire inadéquat peuvent également en être à l'origine. Enfin, la stase et les turbulences causées par un stent sous-dilaté ou mal posé représentent également des facteurs qui promeuvent la TS [417–419,563,565,569] (**Figure 23**).

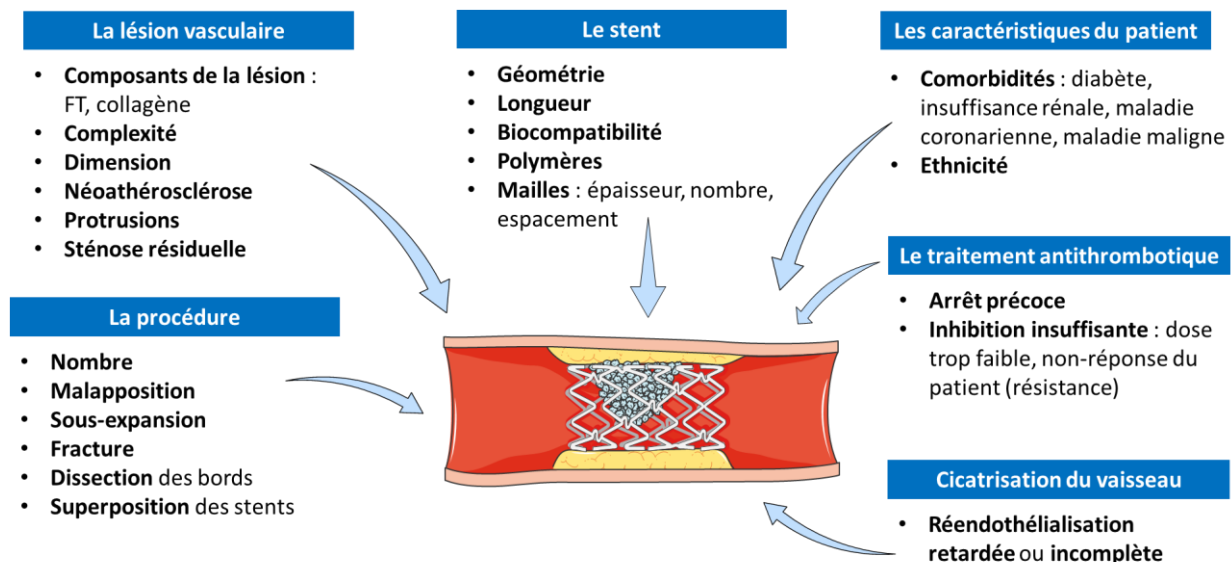


Figure 23 : Les facteurs majeurs responsables de la thrombose de stent

FT : facteur tissulaire.

1. Les caractéristiques du patient

Il a été montré que l'ethnicité du patient contribue à la survenue d'une TS. En effet, les personnes d'origine afro-américaine sont plus à risque de déclencher une TS tardive [419]. Par ailleurs, les comorbidités du patient jouent un rôle important dans l'apparition d'une TS. Le patient a ainsi plus de risques de déclencher une TS précoce s'il est atteint d'un diabète, d'une insuffisance rénale ou encore d'une maladie coronarienne [416,419,565]. Par ailleurs, il a été montré que des prédicteurs de risque pour une TS tardive sont notamment un diabète, une insuffisance rénale et une maladie maligne [419,567]. Enfin, l'âge et la réactivité plaquettaire ont également été proposés comme facteurs de risque indépendants [419,565,570].

2. La lésion vasculaire

La lésion en elle-même, qui contient des facteurs fortement thrombogènes, influence le risque de développer une TS. De plus, sa complexité (exemple : située dans une bifurcation) ou une occlusion quasi totale du vaisseau (exemple : néoathérosclérose) sont des risques supplémentaires de déclencher une TS [417,419,423,565,571]. De même, les lésions étendues

qui nécessitent plusieurs stents ou qui sont situées dans des petits vaisseaux présentent un risque élevé [417,419,569]. C'est également le cas d'une protrusion de la plaque d'athérosclérose dans la lumière du vaisseau ou d'une sténose résiduelle [416,423,565,567].

3. La procédure d'angioplastie avec pose de stent

La procédure d'angioplastie est un facteur important menant à la TS. Il a été montré que de nombreux paramètres procéduraux, tels que l'utilisation de plusieurs stents, une malapposition, une fracture ou une sous-expansion du stent augmentent le risque de TS [416,423,565,567]. Par ailleurs, l'étude CLI-THRO rapporte que la sous-expansion du stent et la dissection de ses bords sont souvent détectées lors d'une TS, alors que c'est moins le cas pour une malapposition du stent et la réduction du lumen [572]. La pose d'un stent dans une bifurcation est aussi un contributeur important à l'apparition d'une TS [416,565]. De même, la superposition des stents, notamment lorsque la lésion est longue ou dans une bifurcation, est un risque de développer une TS [417]. Les facteurs procéduraux sont les principaux acteurs responsables de la TS précoce, ce qui est constaté par des résultats pathologiques similaires entre les différents stents [423,571].

4. Le stent

Les caractéristiques propres du stent telles que la biocompatibilité des matériaux, la géométrie ou encore les polymères employés jouent un rôle important dans la TS. En effet, une incidence accrue de TS très tardives après l'implantation des DES de première génération a conduit à une modification de l'alliage, de la géométrie, des médicaments et du polymère coatés, ces derniers étant responsables d'une hyperinflammation du vaisseau [417,565,567]. Il a été montré que cette inflammation provoque l'infiltration d'éosinophiles, remodelant le vaisseau et menant à une malapposition secondaire du stent, responsable d'une TS très tardive [573]. L'épaisseur des mailles du stent a également un impact sur le développement d'une TS, de même que le nombre et l'espacement entre les mailles ainsi que la longueur du stent [417,419,567,574]. En effet, Iakovu *et al.* ont avancé dans une étude prospective sur une cohorte de patients que la longueur du stent était un facteur prédictif de TS subaiguë : pour chaque augmentation de 1 mm de la longueur, le risque de thrombose était 1,03 fois plus élevé [574].

5. Le traitement antithrombotique

L'arrêt précoce du traitement médicamenteux (voir section **VI.D**) est probablement le risque majeur de développement d'une TS [419,565,567,575]. En effet, la réendothélisation du stent étant lente, les plaquettes sont exposées aux mailles du stent et peuvent être activées, de ce fait l'inhibition de l'activation des plaquettes est un facteur clé de la prévention de la ST précoce [423]. Ainsi, l'interruption de la bithérapie antiplaquettaire est un facteur de risque important de cette dernière [423,575,576]. Cependant, il y a également un risque dû à une inhibition insuffisante des plaquettes soit par une dose trop faible d'antiplaquettaires, soit par une absence de réponse des plaquettes du patient (résistance au clopidogrel) [565].

6. La cicatrisation et la sensibilité du vaisseau

La survenue d'une TS (très) tardive est souvent associée à une réendothélialisation retardée ou incomplète, caractérisée par la présence de zones du stent non couvertes par l'endothélium [418,571]. Un BMS met moins de trois mois pour être endothélialisé, tandis qu'un DES de première génération met plus de temps [571]. Ce retard de cicatrisation à la paroi artérielle suite à l'implantation d'un DES de première génération est probablement responsable des taux plus élevés de TS tardive [474,577].

D. Prévention et traitements

1. Prévention

Les antiplaquettaires ont permis de réduire l'incidence de la TS, ce qui est notamment démontré chez des patients présentant un syndrome coronarien pour qui l'incidence de TS est passée de 24 % à moins de 1 % au cours des dernières décennies [416,566]. Ceci suggère que la diminution de l'incidence des TS observée ces dernières décennies serait attribuée à une amélioration des thérapies antiplaquettaires plutôt qu'à une réduction de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique.

Cependant, leur utilisation est associée à un risque élevé de saignement augmentant le risque de mortalité [417,578]. Pour les patients présentant un angor stable, la ligne directrice pharmacologique est une bithérapie antiplaquettaire pendant six mois après la PCI.

Si les patients présentent un risque élevé d'hémorragie, une bithérapie de plus courte durée est envisagée compte tenu du faible risque de TS après un à trois mois. Chez les patients souffrant d'un syndrome coronarien aigu, une durée de traitement d'un an est conseillée ; en cas de risque hémorragique élevé, une durée plus courte de six mois peut être prescrite [423,567].

Concernant les patients subissant une angioplastie carotidienne, seule l'aspirine est recommandée, afin d'éviter les hémorragies intracrâniennes. Dans cette indication, le taux de TS oscille entre 8,8 et 28,2 % selon le traitement pharmacologique administré avant la pose du stent, mais également selon la précision de la détection chez le patient [579].

Concernant la procédure d'angioplastie en elle-même, la pose du stent doit être évaluée par imagerie pour déterminer l'apposition et l'expansion du stent et ainsi identifier le mécanisme d'apparition de la TS [416,419]. Il est à noter que l'implantation de stents supplémentaires doit être évitée si possible, car chaque millimètre de stent tant dans la longueur que dans le lumen augmente la probabilité de TS [574].

Il est toutefois à préciser qu'un effort important est fait pour optimiser la biocompatibilité des stents et réduire leur potentiel thrombogène. Parmi les améliorations, on peut citer : i) une nouvelle conception du design des stents, ii) la réduction de l'interface stent/sang ou iii) le coating des stents avec des agents pharmacologiques [422,428,580]. Néanmoins, ces mesures n'ont pas permis d'éviter la TS.

2. Traitements

Lorsqu'une TS est détectée, une thrombectomie par aspiration, une thrombolyse ou l'administration d'un inhibiteur de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ doivent être réalisées rapidement pour rétablir la perméabilité du vaisseau thrombosé [416,419,579]. Par ailleurs, il faut procéder à une évaluation de la résistance aux antiplaquettaires et envisager un traitement antiplaquettaire plus puissant [416].

E. Pronostic

La TS est associée à des taux élevés de morbidité et de mortalité. Le patient peut subir un IM suivi ou non d'un choc cardiogénique (défaillance aiguë de la pompe cardiaque entraînant une incapacité à générer un débit sanguin suffisant) lorsque la TS est au niveau coronarien [416,563] ou un nouvel AVC si la TS se développe au niveau carotidien. Cependant, une TS non traitée entraîne généralement le décès du patient.

Comparée à la resténose, qui entraîne des symptômes de type angine, la TS coronarien est un processus aigu entraînant un syndrome coronarien aigu. L'identification et l'intervention précoces améliorent cependant considérablement le pronostic [416,581].

Problématisation du sujet de thèse et principaux objectifs

Les plaquettes assurent un rôle important dans l'arrêt des saignements à la suite d'une lésion vasculaire. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle qui survient à la suite de la rupture d'une plaque d'athérosclérose, pouvant être responsable de diverses pathologies ischémiques. Ainsi survient un AVC ischémique si les artères cérébrales sont occluses, un infarctus du myocarde si ce sont les coronaires, et une artériopathie oblitérante des membres inférieurs lorsque les artères fémorales ou poplitées sont touchées. En plus de traiter la thrombose avec des antithrombotiques, les cliniciens peuvent réaliser une angioplastie pour rouvrir le vaisseau et maintiennent ouvert en installant un stent, rétablissant un flux sanguin normal. Les patients sont alors soumis à un traitement antiplaquettaire pour prévenir la formation d'un nouveau thrombus et une récurrence de la pathologie ischémique. Cependant, si ces traitements ont permis de réduire la morbi-mortalité des pathologies ischémiques, ils ont également des limites, dont le risque de saignement. De plus, ils ne sont pas toujours efficaces dans la prévention d'une complication peu courante, mais extrêmement grave de la pose d'un stent : la thrombose de stent, fatale dans 10 à 40 % des cas. L'objectif central de mon travail de thèse a consisté à **déterminer les mécanismes mis en jeu dans la thrombose de stent afin de mieux la prévenir.**

La thrombose de stent possède deux déterminants majeurs, la plaque d'athérosclérose et le stent. Les différents modèles *in vitro* développés à ce jour ne s'intéressent qu'à la thrombogénicité des stents et ne tiennent pas compte de la thrombogénicité de la plaque d'athérosclérose. De plus, les dispositifs existants se sont limités à l'étude des stents coronaires et ne se sont pas penchés sur l'étude des stents d'autres territoires vasculaires. Le premier objectif de ma thèse a donc été de développer un nouveau dispositif de perfusion à l'échelle de différents vaisseaux humains qui intègre les deux déterminants de la thrombose de stent, qui sont le stent lui-même, et la plaque d'athérosclérose. Une originalité du modèle que j'ai développé est que la chambre en flux est modulable et peut mimer n'importe quelle géométrie, ce qui permet d'évaluer les stents de tous les territoires vasculaires.

Une façon de prévenir la thrombose de stent est de réduire la thrombogénicité des stents, un de ses deux déterminants majeurs. L'incidence de la thrombose de stent étant la plus élevée au niveau carotidien (environ 20 %), comprendre les mécanismes liés à la thrombogénicité des stents carotidiens semble tout à fait pertinent. Le deuxième objectif de ma thèse a alors été d'étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents carotidiens utilisés en clinique en s'appuyant sur le système macrofluidique développé au laboratoire. Sachant que le design du stent joue un rôle particulièrement important dans la thrombose de stent, je me suis focalisée sur l'importance de la rhéologie dans cet évènement.

Les patients présentant une lésion en tandem ont une incidence de thrombose de stent carotidien très élevée (20 %) qui pourrait s'expliquer par le fait que leur traitement repose uniquement sur l'aspirine, un antiplaquettaire faible. Il existe donc un besoin médical de développer des agents antiplaquettaires qui préviendraient la thrombose de stent sans risque hémorragique, car il est important d'éviter les saignements intracrâniens dans cette indication. Il a été montré que la GPVI plaquettaire joue un rôle mineur en hémostase, mais important dans la thrombose expérimentale. Le dernier axe de ma thèse a consisté à évaluer l'intérêt de cibler la GPVI avec le glenzocimab, afin de prévenir efficacement la thrombose sans risque de saignement accru. Pour réaliser ce travail, je me suis principalement appuyée sur le modèle macrofluidique de thrombose de stent que j'ai développé.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

**Analyse des modèles expérimentaux *in vitro* et *ex vivo* permettant
d'étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents cliniques**

Publication 1 :

« Critical analysis of *in vitro* and *ex vivo* experimental models investigating the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents »

Axelle Y. KERN, Pierre H. MANGIN

University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, 10 rue Spielmann,
F-67065 Strasbourg, France

European Symposium on Vascular Biomaterials Congress Book, 2023 Mar.

Introduction

L'insertion de stents, appelée aussi stenting, est devenue une pratique courante lors d'une angioplastie au cours des dernières décennies. Les stents permettent de restaurer le flux sanguin en cas d'occlusion du vaisseau, pour prévenir et traiter les pathologies cardiovasculaires, et sauver ainsi de nombreuses vies. Cependant, ils sont en contact direct avec les cellules sanguines et de la paroi vasculaire, ce qui peut entraîner des réactions défavorables. On peut notamment citer la possible lésion des cellules endothéliales lors de l'ouverture du stent ou la perturbation de l'hémodynamique suite à son implantation. De même, l'activation des plaquettes lors de leur contact avec le stent est une problématique importante puisque le stent est l'un des deux déterminants de la thrombose de stent, une complication rare, mais extrêmement grave de la pose d'un stent sur une plaque d'athérosclérose dans un vaisseau malade. Ainsi, une compréhension approfondie de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique est essentielle pour concevoir des stents moins réactifs et réduire les complications thrombotiques chez les patients subissant une angioplastie.

L'objectif de mon premier papier était de réaliser une revue de la littérature sur les différents dispositifs *in vitro* et *ex vivo* existants pour évaluer la thrombogénicité intrinsèque d'un stent et la thrombose de stent. Cet article présente les principales caractéristiques thrombogènes des stents utilisés en clinique et décrit cinq modèles qui ont été utilisés pour évaluer leur thrombogénicité intrinsèque : la boucle de Chandler, la chambre de perfusion annulaire, le modèle de paillasse circulaire, le système de perfusion Haemobile et le modèle de perfusion *ex vivo* par shunt artério-veineux carotide-jugulaire. Nous y exposons les avantages et les inconvénients de chaque modèle, ainsi que les avancées qui en découlent pour le développement de stents moins thrombogènes et plus biocompatibles.

Ce travail, pour lequel j'ai signé premier auteur, a été accepté sous forme d'un chapitre de livre dans le livre du congrès de l'*European Symposium on Vascular Biomaterials* (ESVB) en mars 2023.

Evaluating the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents

8

Axelle KERN, Pierre H. MANGIN

Stents are increasingly used during angioplasty to prevent and treat cardiovascular pathologies and restore patency in the case of vessel occlusion, thereby saving millions of lives. As stents are in direct contact with blood components, their use is not devoid of complications, with stent thrombosis being the most dangerous. Stent thrombosis can result in life-threatening ischemic events at the site of stent implantation in an atherosclerotic plaque, or at a distance from it. The two main determinants of stent thrombosis are the components of the plaque due to the presence of tissue factor, lipids and fibrillar collagen, and the stent itself. A thorough understanding of the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents is essential to design less reactive stents and reduce thrombotic complications in patients undergoing angioplasty. In this objective, *in vitro* and *ex vivo* approaches are particularly useful. This article highlights the thrombogenic features of clinical-used stents and describes the existing models to evaluate their intrinsic thrombogenicity. It also suggests future strategies to improve the evaluation of stent thrombogenicity in order to design optimal tools ultimately allowing a reduction in stent thrombosis.

Introduction: the burden of stent thrombosis

Percutaneous transluminal angioplasty is used to treat the occlusion or stenosis of diseased arteries, such as the carotid, femoral or coronary artery. Most modern angioplasty procedures also involve stenting, which consists of the implantation of a stent into the diseased vessel to ensure the return to a normal blood flow. While angioplasty with stent implantation has significantly reduced the morbidity and mortality rates of cardiovascular diseases, it is not devoid of complications. Stent thrombosis (ST), which is the most common and a serious complication of angioplasty, represents an important cause of death post-stenting^{1,2}. A definition of ST proposed by the Academic Research Consortium in 2007 standardized the timing, including : acute (within 24 hours), subacute (within 30 days), late (within 1 year) and very late (later than 1 year). The thrombi on stents are mainly composed of platelets, but also contain red blood cells, leukocytes and soluble plasma proteins, including von Willebrand factor (vWF) and fibrin(ogen)³. They can result from diverse causes, linked to the procedure with stent malapposition or fracture, the patient's comorbidities, the lesion itself, which is known to be thrombogenic, a low biocompatibility of the stent, or an inefficient antithrombotic treatment^{1,4-6}. Most ST events appear during the first few days after implantation and almost none after the first month^{2,6,7}. They are particularly harmful for the patients, reaching mortality rates ranging from 10 to 40%^{4,8}.

Antiplatelet and anticoagulant agents are commonly used to prevent ST. The incidence has been dramatically reduced, from 24% of patients in the 1990s to less than 1% nowadays⁹. However, their use is associated with an elevated risk of bleeding which increases the risk of mortality^{4,10}. This is notably a concern in carotid angioplasty where only aspirin is recommended to avoid intracranial bleeding, with the result that the rate of ST lies between 8.8 and 28.2 % depending on the pharmacological treatment administered before stenting¹¹. This suggests that the decrease in the incidence of ST might be attributable to an improvement in the management of antiplatelet therapy rather than to a reduction in the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents.

In addition, over the last decades, an important effort has been made to optimize the biocompatibility of the stents and reduce their thrombogenic potential. Among the improvements, one may cite: i) redesign of the stents, ii) reduction of the stent-blood interface or iii) coating of the stents with pharmacological agents or metal particles⁹⁻¹¹. Nevertheless, these measures have not abolished ST. A better understanding of the cellular and molecular mechanisms leading to ST is therefore crucial to further improve the success of angioplasty.

In this review, we: i) highlight the thrombogenic properties of clinical-used stents, ii) describe the existing models to evaluate their intrinsic thrombogenicity and iii) propose future strategies to produce devices allowing optimal evaluation of the intrinsic thrombogenicity of clinical-used stents and hence to reduce ST.

The thrombogenic features of clinical-used stents

The two main determinants of the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents are the material and the design. They both have an impact on the degree of platelet adhesion and activation and can potentially activate the coagulation pathway, resulting in thrombosis^{12,15}.

The importance of the material

Many materials have been used over the decades to fabricate stents, including stainless steel, tantalum and titanium or cobalt alloys. It is common knowledge that the material composing the stent is itself a major cause of platelet adhesion and activation, and hence of thrombosis. Indeed, artificial surfaces can adsorb plasma proteins, primarily fibrinogen, and in turn recruit circulating blood cells, mainly platelets, to initiate thrombosis^{3,15,16}. Moreover, the stent surface activates the coagulation contact pathway, leading to the generation of thrombin, which is not only the most potent platelet agonist and thereby enhances thrombus growth, but also transforms fibrinogen into insoluble fibrin to stabilize the clot that has formed, preventing the blood flow from removing adherent platelets³.

Stents were initially fabricated with stainless steel 316L, chosen for its mechanical robustness and resistance to corrosion^{12,17,18}. This material nevertheless has a poor flexibility, which can result in stent rupture and lead to medical complications¹⁸. Furthermore, stainless steel has the disadvantages of a diminished radiopacity and a very low biocompatibility, which induces thrombus formation on the metal surface^{12,14,17,18}. In addition, minor amounts of nickel, molybdenum and chromium released from the stainless steel surface can trigger immune and inflammatory responses, leading to platelet and leukocyte activation that can reinforce ST¹².

Titanium- and cobalt-based alloys were developed to favour stent biocompatibility. The spontaneous formation of an oxide film on these materials induces the natural adsorption of proteins and passivates the surface, also preventing stent corrosion. Cobalt-based alloys, such as cobalt-chromium and platinum-chromium, possess a high corrosion resistance and better mechanical properties than stainless steel. They allow one to fabricate thinner stent meshes, thus reducing the coverage of the vessel wall and decreasing the risk of ST^{12,17,19}. However, as in the case of stainless steel, nickel, molybdenum and chromium can migrate over time from the material and produce immunogenic reactions, leading to an inflammatory immune response which is pro-thrombogenic and may favour ST^{14,18,20}. Nitinol, a nickel-titanium alloy, presents the advantages of having a good shape memory and a high radial expansion force which are important for optimal stent expansion¹². Optimal expansion is particularly crucial to avoid local flow disturbances that might generate disturbed flows which are potentially thrombogenic. Another metal used for stent fabrication is tantalum, which possesses high radiopacity^{12,20}. Its surface becomes oxidized after implantation and thereby acquires an interesting level of biocompatibility¹⁹, unlike stainless steel or titanium- and cobalt-based alloys. However, tantalum lacks radial strength and fractures easily, which can lead to various complications including ST^{12,20}.

Gold has also been considered for the development of stents, but this metal does not form a protective oxide layer. It has been shown that materials which do not support oxidation exhibit stronger interaction with plasma proteins such as fibrinogen, promoting platelet adhesion and activation which can result in ST²².

Apart from the material type, the roughness of the material is important as it increases thrombogenicity and this is why it is essential to use surface treatments to obtain a smooth and contamination-free surface¹⁴. To produce a smoother stent surface, various treatments have been developed, including (electro)polishing, ultrasonic cleaning and degreasing¹⁴.

The importance of the design

The material used to fabricate stents is not the only important determinant of ST as the design of the stent can influence the activation of platelets adhering to the struts^{14,20}. Many parameters must be considered when designing a stent, among them the form of the cell, the number of strut-strut intersections, the mesh thickness and the number of layers.

Stent cells can be open or closed. Closed cells do not change shape when the stents are flexed, while open cells change their conformation, especially in the flexed area where they enlarge²¹. Closed cells are associated with a lower risk of the occurrence of atherosclerotic plaque protrusion, which is known to increase per procedural thromboembolic risk. On the other hand, open cells display better flexibility and conformability in curves and tortuous vessels. Nevertheless, most registers have demonstrated no significant clinical advantage of one type over the other²³.

Clinically-used stents have very disparate mesh thicknesses. Moreover, it has been shown that there is a very close link between mesh thickness and stent performance in maintaining a vessel open. Thus, immediate stent performance can be improved by increasing the mesh thickness, which in turn increases the radiopacity, radial strength and arterial wall support^{12,20}. However, excessive mesh thickness, as found in the earliest types of stent, leads to a high metal density and consequently an elevated incidence of subacute ST. These stents were also difficult to use and resulted in frequent deployment failures and distal embolization of thrombotic plaque material^{12,19,20}.

Stents can also be single- or dual-layered. Dual-layer stents have been shown to significantly reduce the incidence of peri- and post-procedural stroke²⁴. However, the double layer almost doubles the foreign body mass and increases flow separation, stagnation and cellular reattachment. This will promote platelet deposition and activation of coagulation with thrombin generation and fibrin formation, thereby favouring ST¹⁵. In agreement with this hypothesis, several studies have reported a higher rate of ST in dual-layer stents, ranging from 9% to more than 50%²⁵⁻²⁷.

Experimental models to evaluate the thrombo-genicity of stents

An in-depth understanding of the thrombogenic properties of stents is essential to develop less thrombogenic ones. Therefore, experimental models have been designed to study the mechanisms by which clinically-used stents promote platelet adhesion, coagulation activation and thrombosis. The main tools developed during the last decades are described in this section.

The Chandler loop system

The Chandler loop system (CLS) was developed by Chandler in the 1950s²⁸ (Figure 1). This device was first set up to produce artificial thrombi and later adapted to study the intrinsic thrombogenicity of stents. The first version was composed of a roller pump which rotated on a 23 degree-inclined plane to induce the circulation of non-anticoagulated whole blood in a closed circular system made of polyvinyl chloride (PVC) tubing. One of the most frequently used versions consists of rotating loops of tubing ensuring passive blood circulation²⁹. In other CLS models, the loops rotate vertically and the blood circulates either passively through rotation of the loop itself or actively through a discontinuous rotation which allows one to mimic a pulsatile flow in the tube^{30,31}. The CLS models are designed to insert a coronary stent inside the tubing, which is then maintained at a physiological temperature of 37°C in a water bath or an incubator. Many other adjustments are possible, including the use of distinct tubing materials such as silicone, Tygon or PVC, coated or not with heparin. The tubes may have different diameters (3-7 mm), allowing one to test various stent types. The CLS is compatible with the use of either whole blood or platelet-rich plasma (PRP) and blood products from different species (human, porcine) which are anticoagulated with sodium citrate or heparin²⁹⁻³⁵. Quantification of the thrombus formation on stents has been performed: i) indirectly by measuring a difference in the platelet count after blood perfusion^{29,31-33,35}, ii) by weighing the clot after perfusion³⁴, or iii) by measuring platelet activation markers such as P-selectin, which indicate the degree of granule secretion³⁰. An advantage of the CLS model is that it permits one to combine several loops and thereby evaluate multiple conditions simultaneously³¹. Another benefit of one of the modified versions resides in the fact that the blood circulates passively by rotation of the loop itself, which avoids the traumatizing effect of an active pumping system^{30,32,33}. One limitation of the CLS devices, at least as they are classically used, is that they do not allow the insertion of a chamber mimicking the geometry of relevant human vessels and hence the pathophysiological conditions found in patients. Moreover, the partial filling of the loop creates a large air/fluid interface which can lead to protein denaturation and blood cell activation, and thereby induce major artefacts.

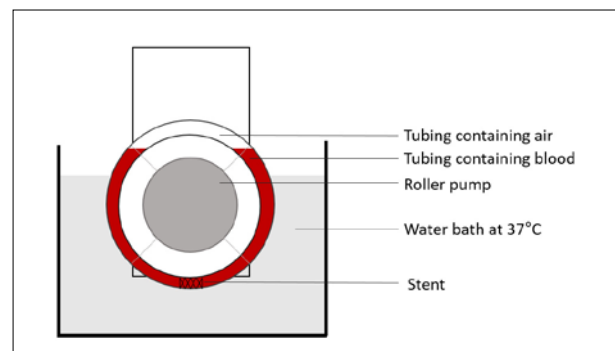


Figure 1: The Chandler loop system is composed of a loop of tubing, partly filled with blood, into which a stent is inserted. The loop is connected to a roller pump and placed in a water bath at 37°C.

The CLS has mostly been employed to study the impact of surface treatment and coating on the intrinsic thrombogenicity of stents. It has been successfully used to show that mechanical and chemical modifications of the stent surface can reduce its thrombogenicity^{29,32}. Indeed, (electro)polished stents display a clear reduction in thrombus formation in comparison to the identical unpolished stents^{29,32}. This model has also helped to provide evidence that coating can play an important role in decreasing

stent thrombogenicity^{29-31,34,35}. Thus, whereas a heparin coating had no beneficial effect, stents coated with polyurethane, a hydrophilic polymer or silicon carbide were less thrombogenic as compared to uncoated stents^{29,31,35}. On the other hand, PVDF-HFP fluorinated copolymer-coated and phosphoryl choline polymer cobalt–chromium stents exhibited similar rates of platelet accumulation and thrombus formation, while parylene C-coated stents were less thrombogenic than copper-coated ones^{30,34}. The CLS also showed that drug eluting stents (DES), notably those covered with anti-proliferative agents such as sirolimus, do not enhance thrombosis as compared to bare-metal stents³³.

The annular perfusion chamber

The annular perfusion chamber (APC) was developed by Sakariassen *et al.* in the 1980s to study the interaction of platelets in flowing blood with cultured human endothelial cells under defined shear rate conditions³⁶ (Figure 2). The original model was an open system composed of a 3 mm diameter elastomer silicone tube connected to a polymethyl methacrylate chamber in which sodium citrated reconstituted human blood circulated at flow rates between 50 and 150 mL/min. This model was later adapted by Zafar *et al.* to investigate the intrinsic thrombogenicity of stents¹⁷. The system was modified to become a closed loop containing a peristaltic pump, where the stent is placed on an inner rod in the APC and maintained at 37°C by immersing the blood reservoir in a water bath. Thrombus formation on the stent is quantified by measuring the surface area covered by fibrinogen and adherent platelets and by determining the aggregate size using a morphometric method. Zafar's APC has the advantage that the cylindrical design of the chamber allows one to test stents under laminar blood flow. However, the model is limited in that the chamber does not reproduce the geometry of coronary arteries, which means that the stent implantation and local rheology probably poorly mimic the clinical situation. In addition, another major limitation resides in the fact that the blood is in contact with the external and not the internal side of the stent, whereas in patients the internal side is exposed to the blood and the external side lies in contact with the diseased artery wall.

The APC model has not been extensively used but has helped to provide evidence that coating the stent can reduce its thrombogenicity. This was notably demonstrated in a study in which electret-coated stents exhibited lower thrombogenicity than non-electret-coated stents or bare-metal ones¹⁷.

The circular bench-top perfusion model

The circular bench-top perfusion (CBTP) model was developed by Beythien *et al.* in the 1980s³⁷ to test the thrombogenicity of coronary stents (Figure 3, next page). The original CBTP model consisted of a closed system containing a peristaltic pump to perfuse blood or plasma at constant flow rates through a 4 mm diameter silicone tube. This system allowed one to insert a stent inside the tubing, which was maintained at a physiological temperature of 37°C by immersion in a water bath. The CBTP model has undergone various modifications in its subsequent versions³⁷⁻⁴³ including: i) the use of different tubing materials like silicone or PVC, which present different diameters (3-4 mm) and enable one to test various stent types, ii) the insertion of a dedicated silicone flow chamber permitting one to mimic complex vessel geometries such as bifurcation, or iii) the use of various pumps including peristaltic (or roller) pumps or a pulsatile pump ensuring a large variety of flow rates ranging from 8 mL/min up to 200 mL/min.

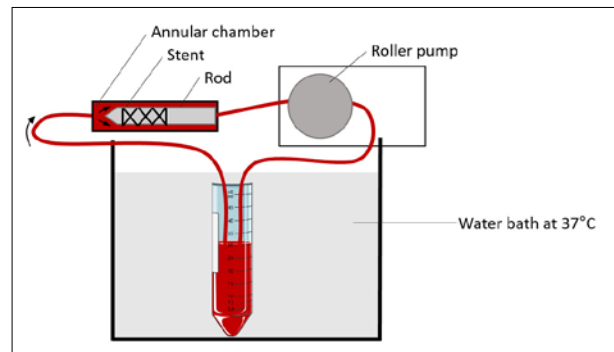


Figure 2: The annular perfusion chamber consists of an annular chamber, into which a stent is inserted on a rod. The tubing is connected to a roller pump and the blood reservoir is placed in a water bath at 37°C.

It should nevertheless be noted that the investigators did not usually take care to try to approach the physiological haemodynamic conditions found in coronary arteries (around 30 mL/min)⁴⁵. Several versions derived from the original CBTP model have been developed over the years, for example that of Gasior *et al.* which differs from the device described above by the insertion of a Y-shaped left main coronary bifurcation chamber⁴⁶. The CBTP system is compatible with the use of either whole blood or PRP from different species (human, porcine) and depending on the studies, the investigators have employed various anticoagulants (acid-citrate-dextrose, sodium citrate, heparin). Thrombus formation on the stents was quantified by measuring the surface area of fluorescently labelled platelets^{37,38,40-42,45} or by determining the fluorescence intensity of activation-dependent platelet antigens like PF-4, P-selectin and CD63^{40,44}. Alternatively, some investigators evaluated thrombus formation by determining the decrease in platelet count in whole blood before and after perfusion^{40,44}. A major advantage of the CBTP model is its simplicity of use, which allows one to combine two systems and therefore test various conditions at once.

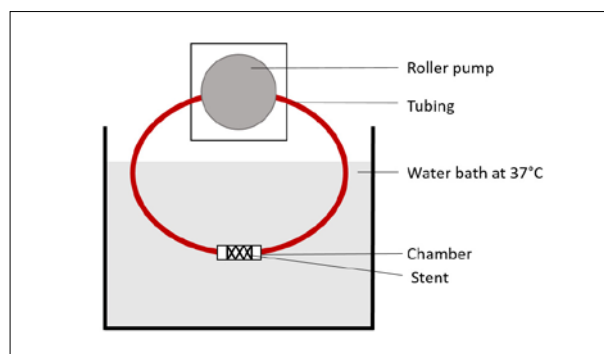


Figure 3: The circular bench-top perfusion model is composed of a loop of tubing, entirely filled with blood, and a perfusion chamber into which a stent is inserted. The loop is connected to a roller pump and placed in a water bath at 37°C.

The CBTP models have helped to improve our understanding of the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents. First of all, they were instrumental in highlighting the impact of the stent structure on its thrombogenicity. Indeed, these models provided evidence that specialized stents with specific geometries, notably those adapted to a bifurcation, reduce thrombus formation⁴⁶. In addition, CBTP models have helped to show that the stent design is also a key parameter with strut thickness and/or number playing an important role in stent thrombogenicity. It has in fact been reported that the thrombogenicity increases when the stents have an excessive number of struts or when the struts are thicker^{37,38,41,45}. These *in vitro* devices have further revealed that some materials used to fabricate stents are thrombogenic, including tantalum, stainless steel and platinum-chromium alloys^{37,42,43}. They also showed that some polymers used to coat stents, in particular polyvinylidene fluoride-co-hexafluoropropene (PVDF-HFP), display a thrombogenic rather than an anti-thrombogenic profile⁴³. On the other hand, CBTP models have provided important evidence that some coatings represent a valuable option to reduce stent thrombogenicity. This was notably demonstrated for albumin, heparin or a diamond-like carbon coating as compared to bare-metal stents^{40,44}. Finally, CBTP devices have been used to obtain evidence that the stenting technique, such as the double kissing crush or T and small protrusion methods, has no significant impact on stent thrombogenicity in a coronary bifurcation model⁴¹.

The Haemobile perfusion system

The Haemobile perfusion system (HPS) was developed by Engels *et al.* in the early 2010s⁴⁷ (Figure 4, next page). The system consists of a motor on which a plateau is mounted to fix the 3 mm diameter PVC tubing loop through which heparinized human whole blood is perfused. Stents are inserted in the tube and the system is maintained at 37°C in an incubator. The blood inside the loop is first accelerated before being decelerated until arrest at the starting position and repeating this process generates a pulsatile flow in the loop. Thrombus formation on the stents is quantified by a colorimetric assay based on the detection of acid phosphatase released by activated platelets. An advantage of the

HPS is the use of a rotating motor, which allows one to generate relevant flow rates producing haemodynamic conditions similar to those found in coronary arteries⁴⁵. A limitation of the HPS is that the tubing used to form the closed loop does not permit the insertion of a flow chamber, with the result that the system is restricted to straight stents with simple geometries and a diameter corresponding to the tube.

The HPS has not been extensively used in the field of stent evaluation. Nevertheless, it allowed some groups to confirm the thrombogenicity of different stent materials and to show that stent coating can play a role in reducing stent thrombogenicity^{47,48}. Indeed, it was demonstrated that polymer-free stents, like their bare-metal analogues, are more thrombogenic than fluoropolymer-coated stents.

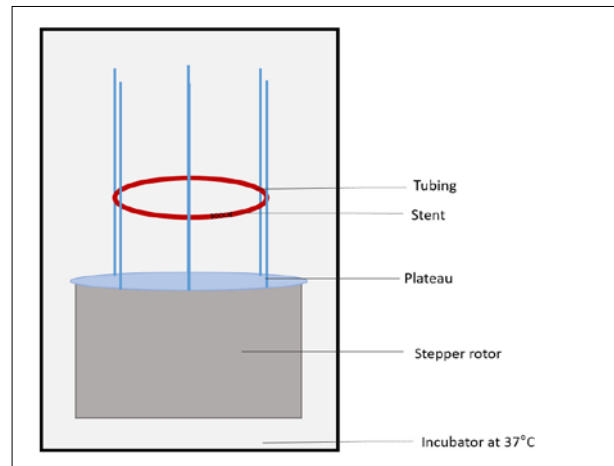


Figure 4: The Haemobile perfusion system consists of a loop of tubing, entirely filled with blood, into which stents are inserted. The loop is mounted on a plateau, which is rotated with a stepper rotor. The system is placed in an incubator at 37°C.

The ex vivo carotid-jugular arteriovenous shunt perfusion model

Besides the classical *in vitro* models, *ex vivo* systems have also been designed to study stent thrombogenicity. Such approaches are based on the use of arteriovenous shunts (AVS) in animal models and in humans (Figure 5). In the original version, developed to simplify the procedure of continuous haemodialysis in patients with acute renal failure, the radial artery and a forearm vein of a human volunteer were linked through a 1/8-inch Teflon tube⁴⁹. Other versions of the AVS model were developed to study intrinsic stent thrombogenicity in different species, including the swine, rat and dog⁵⁰⁻⁵⁸. The AVS system allows the insertion of a stent in the tubing, which is then maintained at 37°C by immersion in a water bath^{50-52,57}. An ultrasonic transducer is used to monitor blood flow and therefore thrombus formation within the system^{50-52,57}. This is particularly important to stop the experiment when the flow rate becomes too slow. The original experimental model has undergone many modifications including the use of different tubing materials such as silicone elastomer, which present different diameters (2-3 mm) and enable one to test various stent types. In addition to measuring the blood flow with a transducer, some investigators quantified thrombus formation on stents by determining the surface area or volume of the thrombi using scanning electron or confocal microscopy or immunofluorescent staining^{50-54,57}, or by weighing the thrombus after collection^{55,56}. An advantage of the AVS model resides

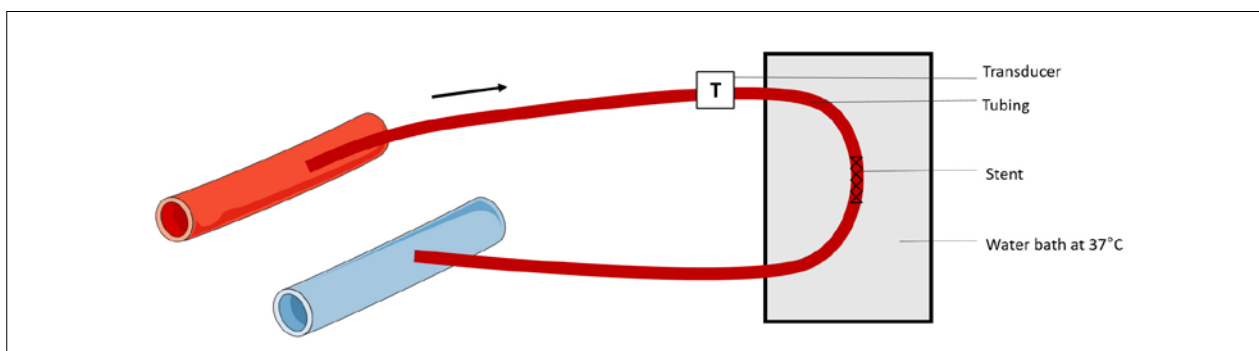


Figure 5: The *ex vivo* carotid-jugular arteriovenous shunt perfusion model is composed of a tube connecting the carotid artery (red) and the jugular vein (blue), into which stents are inserted. An ultrasonic transducer measures the blood flow and the tubing is placed in a water bath at 37°C.

in the fact that several tubes can be connected in parallel and therefore several conditions may be tested at once. Other versions of the model allow one to insert a flow chamber having the geometry of an artery of interest. Moreover, the use of living animals presents a major advantage over *in vitro* systems since it better reproduces physiological conditions with the activation of coagulation and the presence of physiological blood flows.

The diverse AVS models have been important to identify the factors responsible for the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents. They showed that stent composition plays an important role in the acute thrombogenicity of stents⁵⁰⁻⁵⁴. Indeed, it was reported that stents with a permanent polymer coating presented significantly lower acute thrombogenicity than those with a biodegradable polymer coating or polymer-free stents. AVS models have also helped to show that a resorbable magnesium scaffold is less thrombogenic than a stainless steel 316L scaffold equivalent in geometry and design. Such models have further shown that heparin-coated stainless steel stents are less thrombogenic than bare stainless steel ones⁵⁵. Similarly, these models have provided evidence that the surface treatment of stents affects their thrombogenicity, as the total clot weight formed on polished stents is significantly lower than that formed on non-polished stents⁵⁶. Finally, AVS systems have highlighted the fact that the stenting technique in a coronary bifurcation has an impact on the intrinsic thrombogenicity of the stents. Thus, the double-kissing crush technique generates more thrombi on stents at the bifurcation, while the double-kissing culotte technique leads to more thrombi on stents in the proximal main branch^{57,58}.

Discussion

Various experimental models to study the thrombogenicity of clinically-used stents have been developed and adapted over the years. They have helped to define the intrinsic thrombogenic features of stents, especially the material which is usually made of metal. It has been shown that some metals are particularly thrombogenic, notably stainless steel. This has opened up new areas of investigation to develop stents composed of less thrombogenic materials, such as tantalum and platinum-chromium alloys. These observations have also incited researchers and industrials to treat stent surfaces or coat them to reduce their natural thrombogenicity. For instance, stents coated with hydrophilic polymers, silicon carbide, diamond-like carbon and electret have been designed and experiments in models indicate that such coatings decrease their thrombogenicity. Concerning the surface treatment, which also appears to be crucial to reduce stent thrombogenicity, (electro)polished stents display clearly diminished thrombus formation in comparison to non-polished stents. The experimental models described in this chapter have further helped to show that the design of the stent is an important factor in its thrombogenicity. They showed that the characteristics of a stent can be modified to make it less thrombogenic, for example by providing a better design by reducing the strut thickness and/or number, or by adapting the geometry to a specific bifurcation. Indeed, a reduction in thrombus formation was observed in bifurcation-dedicated stents as compared to non-bifurcation-dedicated ones, suggesting that stents adapted to specific geometries are less detrimental. Finally, experimental models have proved useful not only to assess the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents but also to obtain insight into the stenting technique, where they have provided evidence that the double-kissing culotte and double-kissing crush techniques have a minimal adverse impact on thrombosis.

While the numerous experimental systems developed have helped to better identify the determinants of the thrombogenicity of stents, they nevertheless present several limitations. Firstly, they do not reproduce the physiological flow conditions and relevant wall shear rates, as the flow rates used to perfuse plasma-rich platelet or blood usually do not mimic the rheological conditions in the relevant arteries. Since blood flow is a very important factor in haemostasis, regulating not only platelet adhesion, activation and aggregation, but also coagulation, it is probably important to try to reproduce

as closely as possible the physiological flows. It could also be interesting in the future to introduce pulsatility, to mimic even more faithfully the flow found in human arteries. This nonetheless remains very challenging, and even in the field of microfluidic studies of platelet function, the pulsatility is not taken into account by the investigators due to the technical difficulties. One might also wonder if inserting a stent into a straight, smooth and semi-rigid plastic tube or flow chamber really mimics the clinical situation. Designing flow devices which better reproduce the topography and rigidity of a diseased vessel wall would be a big step forward but is still awaiting future developments. Another limitation of the models developed to date stems from the fact that they have only focused on studying the intrinsic thrombogenicity of coronary stents and have not been used and/or adapted to test stents implanted in other arteries, such as the carotid and femoral vessels. One may imagine, however, that the tubing and/or flow chambers, notably thanks to the recent improvements in 3D printing, could be easily adapted to the dimensions of any artery.

The models described here have been particularly important to identify the thrombogenic features of stents. Surprisingly, they have been little used to investigate the underlying mechanism. Thus, the receptors involved in the adhesion of platelets to the stent surface are still unknown. It is tempting to speculate that receptors such as the GPIIb-IX-V complex or α IIb β 3 integrin will mediate platelet accumulation on stents, as they bind to the plasma proteins vWF and fibrinogen. Furthermore, the level of cellular activation following platelet adhesion to a stent is unclear, but very important as this drives platelet aggregation and thrombus growth. It could also be interesting to determine whether platelet adhesion, activation and aggregation on the stent surface differ from the processes involved on lesions in a healthy or diseased vessel, which remains unknown. The models developed to study stent thrombogenicity should be suitable to conduct such studies, thereby shedding new light on platelet/stent interactions. In addition, it might be interesting to adapt the models designed to study stent thrombogenicity to investigate 'stent thrombosis'. Stent thrombosis is a complication of angioplasty occurring in a diseased artery where a stent has been implanted. As a consequence, the determinants of stent thrombosis are not only the stent but also the presence of a ruptured or eroded atherosclerotic plaque. Such plaques are well known to contain highly thrombogenic materials like lipids, tissue factor and various adhesive proteins including fibrillar collagen. The experimental models could be adapted by coating the devices with atherosclerotic plaque homogenates obtained from patients undergoing endarterectomy, as is already done for microfluidic experiments.

In conclusion, the different experimental models developed over the last decades have helped to deepen our understanding of the thrombogenicity of clinically-used stents and to improve their biocompatibility. There is still room to optimize these approaches notably by using more relevant blood flow conditions in the experiments. Novel flow chambers could be designed and inserted into the different devices to explore the thrombogenicity of stents implanted elsewhere than in the coronary arteries, notably in the femoral and carotid vessels. The models could also be used to gain insight into the molecular mechanism through which a platelet-rich thrombus forms on a stent. Finally, another potential application of these devices might be to investigate stent thrombosis, by inserting a stent in a region coated with atherosclerotic plaque extracts. This could further represent an attractive platform to test new antithrombotic agents to prevent thrombosis.

Table 1: Summary of results

Chandler loop system	<ul style="list-style-type: none"> - Surface treatment: (electro)polished stents display less thrombus formation - Coating: stents coated with polyurethane, a hydrophilic polymer and silicon carbide-coated have reduced thrombogenicity
Annular perfusion chamber	<ul style="list-style-type: none"> - Coating: electret-coated stents exhibit diminished thrombogenicity
Circular bench-top perfusion model	<ul style="list-style-type: none"> - Structure: specialized stents with specific geometries reduce thrombus formation - Design: an excessive number of struts or thicker struts leads to increased thrombogenicity - Materials: PVDF-HFP, tantalum, stainless steel and platinum-chromium alloys are thrombogenic - Coating: an albumin, heparin or diamond-like carbon coating reduces stent thrombogenicity - Stenting technique: the double-kissing crush and T and small protrusion methods have no significant impact on stent thrombogenicity
Haemobile perfusion system	<ul style="list-style-type: none"> - Materials: polymer-free stents are more thrombogenic than fluoropolymer-coated stents
Ex vivo carotid-jugular arteriovenous shunt perfusion model	<ul style="list-style-type: none"> - Composition: stents with a permanent polymer coating exhibit lower thrombogenicity - Surface treatment: polished stents have reduced thrombogenicity - Stenting technique: double-kissing crush stenting does not differ from double-kissing culotte stenting in terms of thrombogenicity

References

1. Torrado J, Buckley L, Durán A, Trujillo P, Toldo S, Valle Raleigh J, *et al.* Restenosis, Stent Thrombosis, and Bleeding Complications. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71: 1676-95.
2. Cutlip DE, Baim DS, Ho KKL, Popma JJ, Lansky AJ, Cohen DJ, *et al.* Stent Thrombosis in the Modern Era. *Circulation* 2001; 103: 1967-71.
3. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost* 2015; 13: S72-81.
4. Lotfi A, Reejhsinghani R. Prevention of stent thrombosis: challenges and solutions. *VHRM* 2015; 11: 93-106.
5. Grove ECL, Kristensen SD. Stent thrombosis: definitions, mechanisms and prevention. *ESC Council for Cardiology Practice*. Vol. 5, N° 32. 2007 May;
6. Kirtane AJ, Stone GW. How to Minimize Stent Thrombosis. *Circulation* 2011; 124: 1283-7.
7. Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, Cohen DJ, van Es GA, *et al.* Clinical End Points in Coronary Stent Trials: A Case for Standardized Definitions. *Circulation* 2007; 115: 2344-51.
8. Watts TE, Chatterjee A, Leesar MA. Stent Thrombosis: Early, Late, and Very Late. In: *Cardiovascular Thrombus* [Internet]. 2018. p. 217-24.
9. Moussa I, Di Mario D, Francesco LD, Reimers B, Blengino S, Colombo A. Subacute Stent Thrombosis and the Anticoagulation Controversy: Changes in Drug Therapy, Operator Technique and the Impact of Intravascular Ultrasound. *Am J Cardiol* 1996; 78: 13-7.
10. Baron TH, Kamath PS, McBane RD. Management of Antithrombotic Therapy in Patients Undergoing Invasive Procedures. *N Engl J Med* 2013; 368: 2113-24.
11. Pop R, Zinchenko I, Quenardelle V, Mihoc D, Manisor M, Richter JS, *et al.* Predictors and Clinical Impact of Delayed Stent Thrombosis after Thrombectomy for Acute Stroke with Tandem Lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* 2019; 40: 533-9.

12. Katsanos K, Al-Lamki SAM, Parthipun A, Spiliopoulos S, Patel SD, Paraskevopoulos I, *et al.* Peripheral Stent Thrombosis Leading to Acute Limb Ischemia and Major Amputation: Incidence and Risk Factors in the Aortoiliac and Femoropopliteal Arteries. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2017; 40: 351-9.
13. Lau KW, Mak KH, Hung JS, Sigwart U. Clinical impact of stent construction and design in percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2004; 147: 764-73.
14. Guildford A, Santin M, Phillips GJ. Cardiovascular stents. In: *Biomaterials and Devices for the Circulatory System*. Elsevier; 2010. 173-216.
15. Nazneen F, Herzog G, Arrigan DWM, Caplice N, Benvenuto P, Galvin P, *et al.* Surface chemical and physical modification in stent technology for the treatment of coronary artery disease. *J Biomed Mater Res* 2012; 100B: 1989-2014.
16. Kolandaivelu K, Swaminathan R, Gibson WJ, Kolachalama VB, Nguyen-Ehrenreich KL, Giddings VL, *et al.* Stent Thrombogenicity Early in High-Risk Interventional Settings Is Driven by Stent Design and Deployment and Protected by Polymer-Drug Coatings. *Circulation* 2011; 123: 1400-9.
17. Zafar MU, Bravo-Cordero JJ, Torramade-Moix S, Escolar G, Jerez-Dolz D, Lev EI, *et al.* Effects of electret coating technology on coronary stent thrombogenicity. *Platelets* 2022; 33: 312-9.
18. Jiang W, Zhao W, Zhou T, Wang L, Qiu T. A Review on Manufacturing and Post-Processing Technology of Vascular Stents. *Micromachines* 2022; 13: 140.
19. Scafa Udriște A, Niculescu AG, Grumezescu AM, Bădilă E. Cardiovascular Stents: A Review of Past, Current, and Emerging Devices. *Materials* 2021; 14: 2498.
20. Iqbal J, Gunn J, Serruys PW. Coronary stents: historical development, current status and future directions. *Brit Med Bull* 2013; 106: 193-211.
21. Hara H, Nakamura M, Palmaz JC, Schwartz RS. Role of stent design and coatings on restenosis and thrombosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 377-86.
22. Kolandaivelu K, Edelman ER. Environmental influences on endovascular stent platelet reactivity: An *in vitro* comparison of stainless steel and gold surfaces. *J Biomed Mater Res* 2004; 70A: 186-93.
23. Al-Bayati AR, Nogueira RG, Haussen DC. Carotid Artery Stenting: Applications and Technical Considerations. *Neurology* 2021; 97: S137-44.
24. Mazurek A, Malinowski K, Rosenfield K, Capoccia L, Speziale F, de Donato G, *et al.* Clinical Outcomes of Second- versus First-Generation Carotid Stents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 2022; 11: 4819.
25. Pfaff JAR, Maurer C, Broussalis E, Janssen H, Blanc R, Dargazanli C, *et al.* Acute thromboses and occlusions of dual layer carotid stents in endovascular treatment of tandem occlusions. *J NeuroIntervent Surg* 2020; 12: 33-7.
26. Yilmaz U, Körner H, Mühl-Benninghaus R, Simgen A, Kraus C, Walter S, *et al.* Acute Occlusions of Dual-Layer Carotid Stents After Endovascular Emergency Treatment of Tandem Lesions. *Stroke* 2017; 48: 2171-5.
27. Klail T, Kurmann C, Kaesmacher J, Mujanovic A, Piechowiak EI, Dobrocky T, *et al.* Safety and Efficacy of Carotid Artery Stenting with the CGuard Double-layer Stent in Acute Ischemic Stroke. *Clin Neuroradiol* 2022: 1-8.
28. Chandler AB. *In vitro* thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus. *Lab Invest*. 1958; 7: 110-4.
29. Tepe G, Schmehl J, P Wendel H, Schaffner S, Heller S, Gianotti M, *et al.* Reduced thrombogenicity of nitinol stents – *In vitro* evaluation of different surface modifications and coatings. *Biomaterials* 2006; 27: 643-50.
30. Sinn S, Scheuermann T, Deichelbohrer S, Ziemer G, Wendel HP. A novel *in vitro* model for preclinical testing of the hemocompatibility of intravascular stents according to ISO 10993-4. *J Mater Sci: Mater Med* 2011; 22: 1521-8.
31. Lenz-Habijan T, Brodde M, Kehrel BE, Bannewitz C, Gromann K, Bhogal P, *et al.* Comparison of the Thrombogenicity of a Bare and Antithrombogenic Coated Flow Diverter in an *In Vitro* Flow Model. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2020; 43: 140-6.
32. Tepe G, Wendel HP, Khorchidi S, Schmehl J, Wiskirchen J, Pusich B, *et al.* Thrombogenicity of Various Endovascular Stent Types: An *In Vitro* Evaluation. *J Vasc Inter Radiol* 2002; 13: 1029-35.
33. Walter T, Rey KS, Wendel HP, Szabo S, Suselbeck T, Dempfle CE, *et al.* Thrombogenicity of Sirolimus-eluting Stents and Bare Metal Stents: Evaluation in the Early Phase after Stent Implantation. *In vivo* 2010; 24: 635-9.
34. Chin-Quee SL, Hsu SH, Nguyen-Ehrenreich KL, Tai JT, Abraham GM, Pacetti SD, *et al.* Endothelial cell recovery, acute thrombogenicity, and monocyte adhesion and activation on fluorinated copolymer and phosphorylcholine polymer stent coatings. *Biomaterials* 2010; 31: 648-57.
35. Schmehl JM, Harder C, Wendel HP, Claussen CD, Tepe G. Silicon carbide coating of nitinol stents to increase antithrombogenic properties and reduce nickel release. *Cardiovasc Revasc Med* 2008; 9: 255-62.
36. Sakariassen KS, Aarts PA, de Groot PG, Houdijk WP, Sixma JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components. *Lab J Clin Med* 1983; 102: 522-35.
37. Beythien C, Terres W, Hamm CW. *In vitro* model to test the thrombogenicity of coronary stents. *Thromb Res* 1994; 75: 581-90.
38. Jaryl Ng CKJ, Paradies V, Vlachoianis GJ, Toh HW, Leo HL, Wong EHP, *et al.* Provisional Stenting for the Treatment of Bifurcation Lesions: *In Vitro* Insights. *J Cardiovasc Trans Res* 2021; 14: 595-7.
39. Lu S, Ng J, Ang H, Paradies V, Wong PE, Al-Lamee R, *et al.* Is There Light at the End of the Thin-Strut Tunnel? *JACC: Cardiovasc Interv* 2018; 11: 714-6.

40. Krajewski S, Neumann B, Kurz J, Perle N, Avci-Adali M, Cattaneo G, *et al.* Preclinical Evaluation of the Thrombogenicity and Endothelialization of Bare Metal and Surface-Coated Neurovascular Stents. *Am J Neuroradiol* 2015; 36: 133-9.
41. Paradies V, Ng J, Lu S, Bulluck H, Burzotta F, Chieffo A, *et al.* T and Small Protrusion (TAP) vs Double-Kissing Crush Technique: Insights From *In Vitro* Models. *Cardiovasc Revasc Med.* 2021; 24: 11-7.
42. Perry-Nguyen D, Jung RG, Labinaz A, Duchez AC, Dewidar O, Simard T, *et al.* Evaluation of an *in vitro* coronary stent thrombosis model for preclinical assessment. *Platelets* 2020; 31: 167-73.
43. Eppihimer MJ, Sushkova N, Grimsby JL, Efimova N, Kai W, Larson S, *et al.* Impact of Stent Surface on Thrombogenicity and Vascular Healing: A Comparative Analysis of Metallic and Polymeric Surfaces. *Circ Cardiovasc Interv* 2013; 6: 370-7.
44. Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, *et al.* *In Vitro* Analyses of Diamond-like Carbon Coated Stents: Reduction of Metal Ion Release, Platelet Activation, and Thrombogenicity. *Thrombosis Research* 2000; 99: 577-85.
45. Johnson K, Sharma P, Oshinski J. Coronary artery flow measurement using navigator echo gated phase contrast magnetic resonance velocity mapping at 3.0T. *J Biomech* 2008; 41: 595-602.
46. Gasior P, Lu S, Ng CKJ, Toong WYD, Wong EHP, Foin N, *et al.* Comparison of overexpansion capabilities and thrombogenicity at the side branch ostia after implantation of four different drug eluting stents. *Sci Rep* 2020; 10: 20791.
47. Engels GE, Blok SLJ, van Oeveren W. *In vitro* blood flow model with physiological wall shear stress for hemocompatibility testing – An example of coronary stent testing. *Biointerphases* 2016; 11: 031004.
48. Sperling C, Waliszewski MW, Kherad B, Krackhardt F. Comparative preclinical evaluation of a polymer-free sirolimus-eluting stent in porcine coronary arteries. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2019; 13: 175394471982633.
49. Quinton W, Dillard D, Scribner BH. Cannulation of blood vessels for prolonged hemodialysis. *Hemodial Int* 2004; 23; 8: 6-9.
50. Otsuka F, Cheng Q, Yahagi K, Acampado E, Sheehy A, Yazdani SK, *et al.* Acute Thrombogenicity of a Durable Polymer Everolimus-Eluting Stent Relative to Contemporary Drug-Eluting Stents With Biodegradable Polymer Coatings Assessed *Ex Vivo* in a Swine Shunt Model. *JACC: Cardiovasc Interv* 2015; 8: 1248-60.
51. Waksman R, Lipinski MJ, Acampado E, Cheng Q, Adams L, Torii S, *et al.* Comparison of Acute Thrombogenicity for Metallic and Polymeric Bioabsorbable Scaffolds: Magmaris Versus Absorb in a Porcine Arteriovenous Shunt Model. *Circ: Cardiovasc Interv* 2017; 10: e004762.
52. Lipinski MJ, Acampado E, Cheng Q, Adams L, Torii S, Gai J, *et al.* Comparison of acute thrombogenicity for magnesium *versus* stainless steel stents in a porcine arteriovenous shunt model. *EuroIntervention* 2019; 14: 1420-7.
53. Jinnouchi H, Sato Y, Cheng Q, Janifer C, Kutyna M, Cornelissen A, *et al.* Thromboresistance and endothelial healing in polymer-coated *versus* polymer-free drug-eluting stents: Implications for short-term dual anti-platelet therapy. *Int J Cardiol* 2021; 327: 52-7.
54. Jinnouchi H, Kutyna M, Torii S, Cheng Q, Sakamoto A, Guo L, *et al.* Comparison of acute thrombogenicity and albumin adsorption in three different durable polymer coronary drug-eluting stents. *EuroIntervention* 2021; 17: 248-56.
55. De Scheerder I, Wang K, Wilczek K, Meuleman D, Van Amsterdam R, Vogel G, *et al.* Experimental study of thrombogenicity and foreign body reaction induced by heparin-coated coronary stents. *Circulation* 1997; 95: 1549-53.
56. De Scheerder I, Verbeken E, Van Humbeeck J. Metallic surface modification. *Semin Interv Cardiol* 1998; 3: 139-44.
57. Dan K, Garcia-Garcia HM, Shlofmitz E, Okamura T, Kuku KO, Hellinga D, *et al.* Feasibility of a Porcine Arteriovenous Shunt Model for Assessment of Acute Thrombogenicity in Bifurcation Stenting Technique by Optical Coherence Tomography. *Cardiovas Revasc Med* 2020; 21: 1000-5.
58. Dan K, Bhogal S, Kuku KO, Melaku GD, Devineni A, Hellinga D, *et al.* Optical coherence tomography assessment of acute thrombogenicity at bifurcation sites using different stenting techniques: A porcine arteriovenous shunt study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2022; 99: 1998-2005.

Conclusion

Cette revue décrit les modèles expérimentaux permettant d'étudier la thrombogénicité des stents utilisés en clinique. Elle met également en lumière les adaptations au cours du temps des dispositifs qui ont amélioré leur performance et leur pertinence. Ces modèles ont facilité la définition des caractéristiques thrombogènes intrinsèques des stents, telles que le matériau, son coating ou encore son design. Leur utilisation a donc ouvert de nouveaux champs d'investigation pour développer des stents moins thrombogènes et améliorer leur biocompatibilité. Toutefois, aucun modèle développé à ce jour ne rend possible l'évaluation de la thrombogénicité intrinsèque des stents en conditions de flux similaires à celles retrouvées chez l'Homme. En effet, seul le modèle de paillasse a la possibilité d'insérer une chambre à la dimension des vaisseaux humains, mais nous n'avons pas trouvé d'éléments allant dans ce sens. Ainsi, ces différents systèmes ne reproduisent pas les conditions physiologiques d'écoulement et les taux de cisaillement de la paroi observés chez les patients. De même, ils se sont uniquement concentrés sur l'étude de la thrombogénicité intrinsèque des stents coronaires et n'ont pas été adaptés pour tester des stents implantés dans d'autres artères, telles que les vaisseaux carotidiens et fémoraux. Enfin, ils n'ont étudié que la thrombogénicité des stents et non pas la thrombose de stent, qui intègre également la part thrombogène d'une artère malade.

**Développement d'un nouveau modèle macrofluidique pour étudier
la thrombogénicité des stents et développer des stents moins
thrombogènes**

Publication 2 :

**« A macrofluidic model to investigate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents
and develop less thrombogenic stents »**

Axelle Y. Kern¹, Yevgeniy Kreinin², Lise Charle¹, Mark Ephstein², Netanel Korin^{2*}, Pierre H. Mangin^{1*}

Affiliations: ¹University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR_S1255, FMST, F-67065 Strasbourg, France; ²Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

* Co-last authors

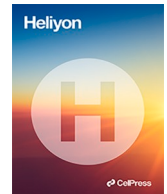
Heliyon, 10, 2024 Feb, e26550.

Introduction

La pose d'un stent, aussi appelé stenting, est devenue une pratique courante dans le cas d'une angioplastie. Elle a pour but de maintenir le vaisseau ouvert et d'assurer le retour à une circulation sanguine normale. Si l'angioplastie avec stenting a permis de réduire considérablement les taux de morbidité et de mortalité liés aux maladies cardiovasculaires, l'une de ses principales complications est la thrombose de stent, dont le taux de mortalité est très élevé. Les facteurs responsables de la thrombose de stent sont non seulement la plaque d'athérosclérose rompue, qui contient du matériel hautement thrombogène, mais aussi le stent en lui-même. Les modèles microfluidiques ne sont pas adaptés à l'étude des interactions des plaquettes avec les surfaces étrangères des dispositifs médicaux tels que les stents, principalement en raison des dimensions et de la géométrie des canaux microfluidiques. Par ailleurs, bien que certains modèles expérimentaux aient été développés pour étudier la thrombogénicité des stents (voir article Kern *et al*, *ESVB*, 2023), ils présentent tous des limitations majeures, dont les plus importantes sont l'absence d'une chambre de perfusion mimant la géométrie des vaisseaux humains pour se rapprocher des observations cliniques, et le fait qu'ils ne reproduisent pas les conditions pertinentes d'écoulement retrouvé chez les patients.

L'objectif de mon deuxième papier a été de mettre au point un modèle permettant d'évaluer la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. Le modèle repose sur l'utilisation de chambres mimant la géométrie précise de l'artère coronaire, fémorale ou carotidienne humaine. Il est parfaitement adapté à l'insertion d'un stent clinique en vue d'étudier son interaction avec les cellules sanguines. La chambre est insérée dans un système de perfusion circulaire fermé permettant de perfuser du sang humain total hirudiné aux débits physiologiques que l'on trouve dans les artères susmentionnées. L'accumulation de plaquettes marquées par fluorescence sur la surface du stent est réalisée à l'aide de la vidéo-microscopie. Par ailleurs, la microscopie électronique à balayage a révélé la formation de très gros thrombi, composés de plaquettes compactes et hautement activées sur les stents.

Ce travail, pour lequel j'ai signé premier auteur, a été accepté sous forme d'un papier méthode dans le journal *Heliyon* en janvier 2024.



Research article

A macrofluidic model to investigate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents and develop less thrombogenic stents

Axelle Y. Kern^a, Yevgeniy Kreinin^b, Lise Charle^a, Mark Epshteyn^b, Netanel Korin^{b,1}, Pierre H. Mangin^{a,*}

^a University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR_S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France

^b Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

ARTICLE INFO

Keywords:

Stent
Macrofluidic
Flow chamber
Platelet
Thrombus
Carotid
Femoral
Coronary
Arteries

ABSTRACT

Microfluidic blood flow models have been instrumental to study the functions of blood platelets in hemostasis and arterial thrombosis. However, they are not suited to investigate the interactions of platelets with the foreign surfaces of medical devices such as stents, mainly because of the dimensions and geometry of the microfluidic channels. Indeed, the channels of microfluidic chips are usually rectangular and rarely exceed 50 to 100 μm in height, impairing the insertion of clinically used stents. To fill this gap, we have developed an original macrofluidic flow system, which precisely reproduces the size and geometry of human vessels and therefore represents a biomimetic perfectly suited to insert a clinical stent and study its interplay with blood cells. The system is a circular closed loop incorporating a macrofluidic flow chamber made of silicone elastomer, which can mimic the exact dimensions of any human vessel, including the coronary, carotid or femoral artery. These flow chambers allow the perfect insertion of stents as they are implanted in patients. Perfusion of whole blood anticoagulated with hirudin through the device at relevant flow rates allows one to observe the specific accumulation of fluorescently labeled platelets on the stent surface using video-microscopy. Scanning electron microscopy revealed the formation of very large thrombi composed of tightly packed activated platelets on the stents.

1. Introduction

The occlusion or stenosis of diseased arteries such as the carotid, femoral or coronary artery is often treated by percutaneous transluminal angioplasty. This procedure involves stenting to reopen the vessel and ensures the return to a normal blood flow. While angioplasty with stent implantation has significantly reduced the morbidity and mortality rates related to cardiovascular diseases, one major complication of this procedure is stent thrombosis (ST), which represents an important cause of death post-stenting with mortalities ranging from 10 to 40% [1–4]. The incidence of ST in the coronary arteries has decreased markedly with the use of dual antiplatelet therapy, but the mortality rate is still very elevated and it therefore remains a medical concern that needs to be studied in detail, using refined experimental models [1,5,6]. The thrombi formed on the stents have diverse origins. They can result from the procedure itself, due to stent malposition or fracture, or from the patient's comorbidities, the lesion, a low biocompatibility of the stent, or an inefficient antithrombotic treatment [1,3,7]. This means that the determinants of stent thrombosis are not only the ruptured or

* Corresponding author.

E-mail address: pierre.mangin@efs.sante.fr (P.H. Mangin).

¹ Co-last authors.

eroded atherosclerotic plaque which contains highly thrombogenic material, but also the stent *per se*, notably its design and material.

It has been shown that the materials used to fabricate stents, including stainless steel, tantalum and titanium or cobalt alloys, are thrombogenic as they support platelet adhesion and activation. Indeed, artificial surfaces can adsorb plasma proteins, primarily fibrinogen, which in turn recruit circulating blood cells, mainly platelets [8–10]. Moreover, the stent surface activates the coagulation contact pathway, leading to the generation of thrombin, which is not only the most potent platelet activator, but also transforms fibrinogen into insoluble fibrin, stabilizing the clot that has formed and preventing the blood flow from removing adherent platelets [8]. The design of the stent is another important factor influencing its thrombogenicity, with the strut thickness, number and geometry playing important roles. It has notably been reported that dual-layered stents present a higher rate of ST than single-layered stents, although the underlying mechanism remains poorly defined [11–13].

While some experimental models have been developed to identify the determinants of stent thrombogenicity, they all present major limitations [14–17]. Firstly, they do not reproduce the physiological flow conditions and wall shear rates, since the flow rates used do not mimic the rheological conditions in the relevant arteries. Blood flow is a major factor in hemostasis and thrombosis as it regulates not only platelet functions but also coagulation. Thus, it is probably important to try to reproduce as closely as possible the physiological flows. Another limitation of the current models is that inserting a stent into a straight, smooth and semi-rigid plastic tube does not really mimic the clinical situation, nor the complex flows existing around the stent. Hence, designing flow devices which better reproduce the topography and rigidity of a diseased vessel wall would be a big step forward [10,16–18].

We have developed a device to assess the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents. The model relies on the use of flow chambers mimicking the precise geometry of any human vessel, including the coronary, femoral or carotid artery. This device presents the advantage of enabling the easy insertion of a stent into the chamber as it is done in patients. The chamber is then incorporated into a closed circular perfusion system allowing one to perfuse fresh hirudinized whole blood through it at the physiological flow rates found in the aforementioned arteries.

2. Materials and methods

2.1. Resource availability

2.1.1. Lead contact

Requests for resources and additional information should be addressed to Dr Pierre H. Mangin (pierre.mangin@efs.sante.fr).

2.1.2. Data availability statement

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

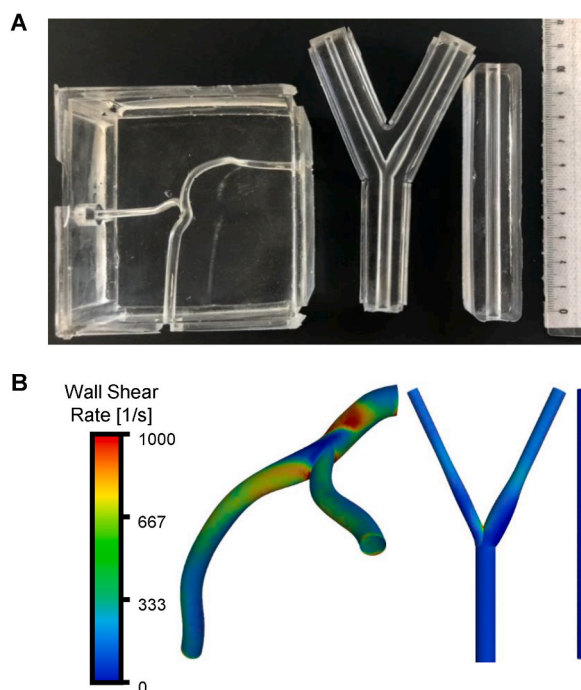


Fig. 1. Macrofluidic flow chambers and their characterization.

(A) Flow chambers modeling the left anterior descending coronary (left), carotid (middle) and femoral (right) arteries and (B) wall shear rate distributions within the models. Wall shear rate distributions were extracted by computational fluid dynamics simulations.

2.2. Experimental model and subject details

All blood donors were healthy volunteers who gave their free and informed written consent to participate in our study, which conformed to the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Legal and ethical authorization for the use of blood collected for research was obtained through a national convention between the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675). Neither the age, nor gender of the donor was recorded.

2.3. Method details

2.3.1. Fabrication of the macrofluidic flow chamber

We use a unique size of common carotid and femoral artery chamber having a diameter of 6 mm. In the case of the coronary artery, the chambers mimic a 4 mm diameter left main coronary artery, a 3 mm diameter circumflex artery and a 3 mm diameter left anterior descending (LAD) artery, which is our artery of focus.

The flow chambers reproduce the average dimensions of human arteries, including the femoral, carotid and coronary arteries (Fig. 1A, Table 1). The chamber is designed with Autodesk Fusion 360 (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) and a skeleton mimicking the lumen of the artery is printed in 3D with borders using a Form 3 B + printer (Formlabs GmbH, Berlin, Germany). The print supports are removed and the skeleton is sanded with sanding paper P180 and P1000 and polished with “pierre d’argent”, composed of clay and soap, cleaned with 70% ethanol to eliminate all sanding residues and lacquered with vanish to obtain the smoothest possible surface. Plastic strips from sheet protectors are glued onto the borders of the skeleton, which is then fixed on a Plexiglas board with acrylic mastic and left overnight at room temperature to avoid any artefacts due to leaking of the material. The chamber is cast with either 45 g of silicone elastomer (Elastosil RT601 A/B, IMCD, Lyon, France) or polydimethylsiloxane (PDMS Sylgard 184, Samaro, Villebon sur Yvette, France) for the carotid and femoral chamber, or 300 g for the coronary chamber. Silicone elastomer has a ratio of 9:1 (W/W) of the components A and B, respectively, component A containing the platinum-based catalyst and component B the polymerization agent. PDMS has a ratio of 10:1 (W/W) of the components A and B, respectively, component A containing the base and component B the curing agent. These materials have the advantage of transparency, which facilitates observation through the walls of the chamber. PDMS is preferred to silicone elastomer if the chamber is to be coated, as the coating “detaches” itself from silicone elastomer once the platelet aggregates become too big. The mold is left to dry at room temperature for at least 48 h if made of silicone elastomer, or heated to 70 °C for 3 h if made of PDMS. The chamber is then immersed in acetone to weaken and dissolve the skeleton, for 24–48 h for the femoral and carotid chamber, or for a few days for the coronary chamber because the walls are thicker. Remaining pieces of the skeleton may need to be removed with tweezers, especially at the bifurcation. Thin branches of bamboo are used to remove remaining parts of the skeleton in the coronary chamber, as bamboo is both rigid and flexible enough to pass through the bifurcation in the middle of the chamber.

The wall shear rate maps under these conditions of flow and vessel geometry, extracted using computational fluid dynamics (CFD) simulations (see Supplementary Method), are shown in Fig. 1B and demonstrate the complex shear profiles existing in the carotid, femoral and LAD coronary arteries.

A significant advantage of chambers having the size of human vessels over traditional microfluidic flow chambers is the reproduction of the morphology of human vessels, which allows one to mimic the rheology found in these vessels when using relevant flow rates. However, a major limitation is the volume of blood needed, about 150 mL per perfusion, which implies a limited number of experiments per day for one donor.

2.3.2. Collection of human whole blood

Blood is collected *via* venipuncture from the antecubital vein of consenting healthy volunteers who have not taken any antiplatelet medication during the ten days preceding the donation. An arterio-venous fistula 17G needle is used to obtain a freely running flow. The blood is collected directly into polypropylene Falcon tubes containing 5 mL of a solution of the α -thrombin inhibitor hirudin (final concentration: 100 U/mL) (Transgene, Illkirch-Graffenstaden, France). It is drawn at a reasonably slow and steady rate, taking care to avoid frothing which could activate platelets, and is immediately mixed by gentle inversions of the tube. The first few milliliters of blood are discarded to avoid the effects of traces of thrombin generated during venipuncture. The anticoagulated blood is maintained at physiological temperature (37 °C) in a water bath without agitation and used within 4 h of collection.

Table 1
Dimensions of the macrofluidic flow chambers.

Artery	Internal diameter (mm)	Length (mm)
Common carotid	6	52.5
Internal carotid	4.3	60
External carotid	3.7	60
Femoral	6	100
Left main coronary	3.61	70
Circumflex	2.77	60
Left anterior descending (LAD)	2.8	60

2.3.3. Blocking non-specific platelet interactions with human serum albumin

Whether it has been previously coated or not, the chamber is always passivated to avoid non-specific platelet interactions with the material of the walls. Fatty acid free human serum albumin (HAS 1%) (Sigma-Aldrich, Lyon, France) is injected into the chamber with a Pasteur pipette and left at room temperature for 30 min. To correctly fill the carotid and coronary chambers, it may be necessary to block one vessel while inserting the pipette into another. Once the first two vessels have been filled, one of them is blocked to fill the last one. HSA is later drawn out of the chamber and PBS (supplemented with 2 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2) (Sigma-Aldrich) is introduced in the same way as HSA for the time necessary before starting the flow experiment.

2.3.4. Fluorescent labeling of platelets

Monitoring of platelet aggregates and quantitation of thrombus growth by fluorescence macroscopy requires the fluorescent labeling of platelets. The main fluorescent dye used in our laboratory is the lipophilic carbocyanine fluorochrome DiOC₆ (3,3'-dihexyloxa-carbocyanine iodide, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), which does not cause platelet activation. An additional advantage of this dye is that only platelets and leukocytes are visualized in the presence of red blood cells (RBC), as the fluorescence is quenched by the hemoglobin contained in RBC. Moreover, in a healthy person, the leukocyte count is sufficiently low to be considered as negligible. Platelets are labeled prior to perfusion with DiOC₆ by incubation of whole blood at room temperature with 1 μM DiOC₆ for 5 min, which corresponds roughly to the time needed to make the last preparations for the flow run.

2.3.5. Basic flow assay

2.3.5.1. Assembly of the perfusion system. The complete perfusion system is shown in Fig. 2 and the various connectors and tubes (Watson-Marlow, La Queue-Lez-Yvelines, France) used to assemble it are depicted in Fig. 3. The tubing used is strong, durable, reusable, easy to clean and does not support non-specific platelet adhesion. .

1. Adjust the pump head to the size of the tubing used (align 6.4 with 1.6 as the internal diameter of the tubing is 6.4 mm, with a wall thickness of 1.6 mm).
2. Put a sheet under the peristaltic pump and near the macroscope to protect it in case of a leak and a black paper under the macroscope to increase the contrast on images.
3. Assemble the system as in Fig. 3 (see Tables 2 and 3 for the tubing and connectors, respectively).
 - a. Connect tubing 1 with a connector 7.
 - b. Connect the tubes 2 with the above connector 7 and a second one, respectively.
 - c. Connect tubing 3 with the above connector 7 and a connector 8 for a carotid or femoral flow chamber. Replace the connector 8 by a connector 9 for the coronary chamber.
 - d. Assemble the 3-way tap using connectors 10, 11 and 12.

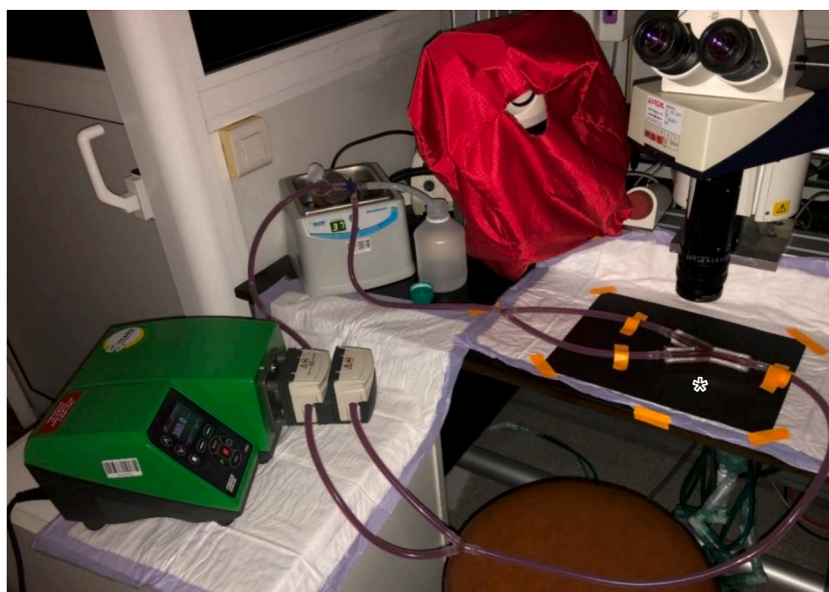


Fig. 2. Macrofluidic perfusion assembly using a carotid artery flow chamber. The system is composed of a blood reservoir in a water bath at 37 °C and a peristaltic pump perfusing at 380 mL/min through the carotid macrofluidic flow chamber placed on a black paper under a fluorescence macroscope (star *). The blood flows in a closed loop back into the reservoir. A liquid bin is also connected to the flow path and a three-way tap allows one to switch between the bin and the reservoir.

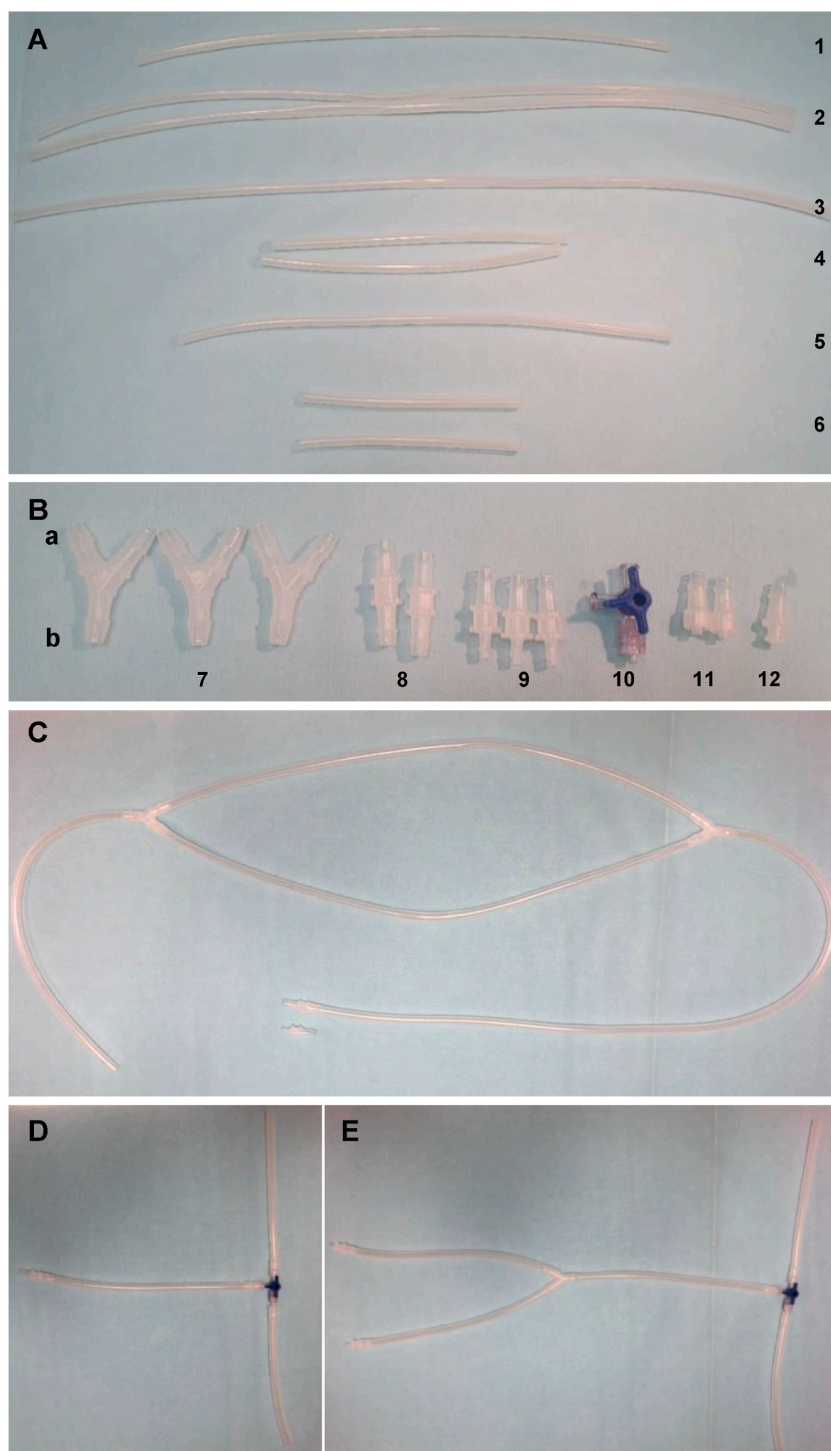


Fig. 3. Tubing and connectors required for the perfusion system.

(A) Tubing and (B) connectors used to assemble the perfusion system. Parts a of the connectors are for the inlet of blood and parts b for the outlet. (C) Perfusion system before the inlet of the flow chamber. The tubes 2 are joined to connectors 7, inlet a. Tubing 1 is connected to the outlet b of one of the connectors 7 and tubing 3 to the other. According to the flow chamber used, tubing 3 is joined to the inlet a of either a connector 8 (carotid and femoral chambers) or a connector 9 (LAD coronary chamber). (D, E) D shows the second part of the femoral chamber. Part a of a connector 8 is connected to the chamber and part b to a tube 4. E depicts the carotid and coronary chambers. The parts a of two connectors 9 are joined to tubes 4. Parts b are connected to the chamber. The three-way tap is assembled and connected to tubing 4 for the middle connector and to tubing 6 on both sides of the tap.

Table 2
Dimensions of the Watson Marlow pumpsil tubing required for the perfusion system.

Tubing n ^o ^a	Internal diameter (mm)	Wall thickness (mm)	Length required (cm)	Number of tubes required
1	6.4	1.6	40	1
2	6.4	1.6	67	2
3	6.4	1.6	70	1
4	6.4	1.6	25	2
5	6.4	1.6	34	1
6	6.4	1.6	17	2

^a Refer to Fig. 3A.

Table 3
Dimensions of the connectors required for the perfusion system.

Connector n ^o ^a	Internal diameter a (inlet) (mm)	Internal diameter b (outlet) (mm)	Number of connectors required
7	6.4	6.4	3
8	6.4	6.4	2
9	6.4	4.8	3
10	6.4	6.4	1
11	6.4	6.4	2
12	6.4	6.4	1

^a Refer to Fig. 3B.

e. Connect:

- i. Both tubes 4 with a connector 7 and a connector 9 for a carotid or coronary flow chamber.
 - ii. One tube 4 with a connector 7 and a connector 8 for a femoral flow chamber.
- f. Connect tubing 5 with the above connector 7 and the tap.
 - g. Join both tubes 6 to the tap to close the system and link to the liquid bin.
 - h. Insert the stent into the chamber if the experiment requires one. A femoral stent (Lifestent 40 × 8 mm, Bard – Medical Materials, Florida, USA) is placed in the middle of the chamber, a carotid stent (Wallstent Monorail 8 × 29 mm, Boston Scientific S.A.S, France; Casper 8 × 30 mm, Microvention, France), at the bifurcation of the internal and common carotids and a coronary stent (Xience Sierra 4 × 12 mm, Abbott – Medical Materials, Florida, USA) at the bifurcation, mostly in the LAD part and a little in the left coronary artery.
 - i. Connect the flow chamber to connectors 8 and 9 if necessary.
4. Perfuse PBS through the system to the liquid bin at the flow rate to be used for the experiment, to clean the tubing and connectors. Make sure there are no leaks around the connectors.
 5. Stop the flow, replace PBS by the labeled blood and perfuse it to the liquid bin until all PBS has been cleared from the system.
 6. Once the whole system has been filled with blood, switch to the closed circuit. Tapping on the tubing and flow chamber allows one to remove air bubbles.
 7. Observe the chamber under the microscope (Leica Z16 APO with plan Apo1/×0.57, Leica Microsystems, Nanterre, France; Orca Fusion Digital Camera C14440, Hamamatsu, USA) to take time-lapse images. Freeze the scale of intensity.

2.3.5.2. Perfusion of blood. Prior to a perfusion assay, establish the required rheological parameters for the given experiment. These include the desired flow rate according to the flow chamber used, the total volume of blood needed and the duration of perfusion. Strict attention should be paid to the volume of blood to be perfused, as a minimum of 150 mL is required. Once the rheological parameters have been established, the required volume of whole blood is carefully transferred to the reservoir of the perfusion assembly, labeled with DiOC₆ and stored at 37 °C in the water bath. PBS flow is initiated by starting the peristaltic pump and switching the three-way tap to the PBS reservoir, to ensure cleaning of the system before perfusing blood and check for the absence of leaks. Once 100 mL of PBS has passed, the pump is stopped to change from the PBS to the blood reservoir. The flow rate is set to 380 mL/min for the carotid and 200 mL/min for the femoral and LAD coronary flow chambers, reproducing the average flows found in these arteries [19–21]. Blood flow is then initiated as described above, switching the three-way tap to the blood reservoir. As PBS is susceptible to activate platelets, the first few of milliliters of blood are directed to the liquid bin before the return flow is switched to the reservoir. The perfusion experiment is terminated by continuous perfusion of PBS at the same flow rate to remove all non-adherent cells along with RBC. The majority of non-adherent cells should be flushed from the tubing within 2 min.

2.3.5.3. Cleaning of the perfusion system. At the end of an experiment, all tubes and connectors are filled with FlowClean (Beckmann Coulter, Villepinte, France), left for 20 min and then rinsed with copious volumes of water without detergent and air-dried. Depending on the level of use, the tubing is replaced every two to four months.

2.4. Quantification and statistical analyses

2.4.1. Quantification of platelet aggregates using ImageJ software

The images obtained during time-lapse monitoring and mapping can be analyzed with several different programs, but we use ImageJ software to quantify the fluorescent surface, which corresponds to the platelet aggregates. The edges of the flow chamber to analyze are drawn manually and a measurement is made to obtain the whole area. The threshold is then set to cover the platelet aggregates formed and the area of the aggregates is determined. Any fluorescence outside the drawn edges due to the chamber material is not taken into account. The ratio of the fluorescent area to the total area allows us to quantify and compare the platelet aggregation under different conditions.

2.4.2. Statistics

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). The statistical significance between different groups was assessed using the Kruskal-Wallis test. The p values of <0.05 were considered to be significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

In Fig. 4C–a Kruskal-Wallis test was performed on 4 of the 5 groups; n was the number of experiments performed and thus the number of stents used. In the control group, $n = 10$ but one value was excluded after a ROUT test with $Q = 0.5\%$ (GraphPad Prism 9.4.1); in the Casper group, $n = 6$; in the Wallstent group, $n = 6$; in the Lifestent group, $n = 4$. The Xience group was too small, $n = 2$, to perform an analysis.

3. Results

3.1. Monitoring thrombus formation under flow

Areas of observation are defined according to the flow chamber used. We selected specific regions where thrombus formation on stents has been recorded, including the internal carotid artery, the middle of the femoral artery and the bifurcation of the left anterior descending (LAD) coronary artery. However, any other region of the chamber can be imaged either in real-time or at the end of the

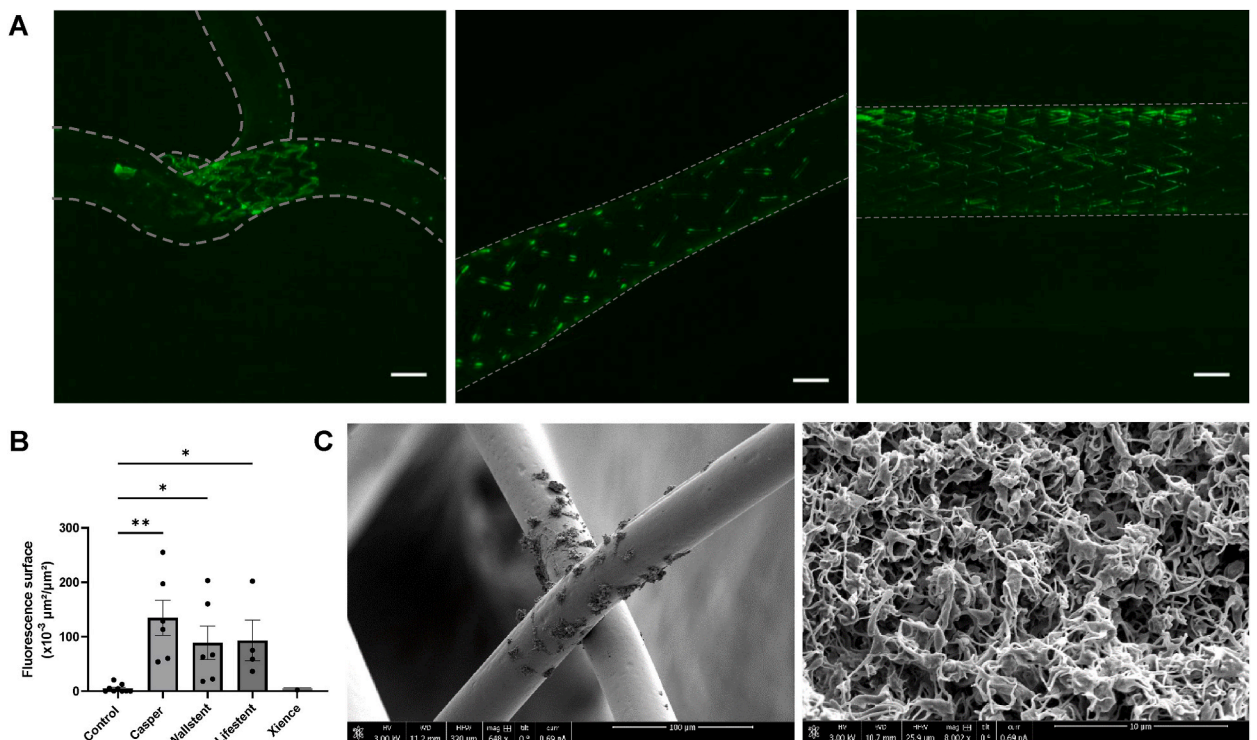


Fig. 4. Images of platelet aggregates on stents.

(A) LAD coronary (left), carotid (middle) and femoral (right) artery stents after perfusion for 1 h with blood labeled with DiOC₆. Scale bar: 2 mm. (B) Surface area quantification of platelet aggregation on a carotid stent (Casper and Wallstent), a femoral stent (Lifestent) and a LAD stent (Xience) (** $p = 0.0014$; * Wallstent $p = 0.0139$; * Lifestent $p = 0.319$). Values are the mean \pm standard error of the mean. (C) Scanning electron microscopy images of a carotid stent after perfusion with blood for 1 h. Aggregates are observed at the intersection of the stent meshes (left) and are composed of tightly packed activated platelets (right).

experiment. As whole blood is perfused for 1 h, a picture is taken every 15 s in order to observe the growth of the thrombus on the stent. We check for the absence of air bubbles inside the chamber and tubing, before the flow experiment, to avoid air/blood contact which is deleterious and might induce artefacts. To eliminate air bubbles, one can remove them by tapping softly on the tubing and chamber. We also ensure that the outlet tubing is inserted at the bottom of the blood reservoir, so as to always renew the blood. Moreover, the tubing through which blood returns to the reservoir is placed against the reservoir wall to stop the blood “falling” and avoid the risk of platelet activation. When the flow experiment is over, the whole chamber is mapped by taking multiple pictures (Fig. 4A). Quantification is performed over the entire area of the stent (Fig. 4B).

Observation of platelet thrombi using scanning electron microscopy.

Once the whole chamber has been imaged, it is cut open to extract the stent. This step must be performed carefully and the stent should not be manipulated directly to avoid deforming it and thereby damaging the thrombi present on the stent struts. The stent is then placed in a Falcon tube and fixed in 2.5 % glutaraldehyde solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) for at least 1 h at 4 °C. It is important to entirely cover the stent surface with the fixative solution. After removing the fixator and replacing it with cacodylic acid buffer, the tube is placed in a refrigerator at 4 °C. The stent can be conserved for several weeks in this buffer.

To dehydrate it, the stent is first rinsed twice in distilled water, before incubating it in aqueous solutions containing increasing concentrations of ethanol (75%, 80% and 95%), for 5 min each time. The stent is then incubated twice for 20 min in absolute ethanol. It is particularly important not to leave the stent too long in contact with air to avoid its rehydration. Once the stent has been dehydrated, it is placed in solutions composed of hexamethyl-1,1,1,3,3,3-disilazane (HMDS, Sigma-Aldrich) and absolute ethanol: 25% HMDS/75% ethanol, 50% HMDS/50% ethanol and 75% HMDS/25% ethanol, for 5 min each time. Finally, the stent is incubated twice for 5 min in pure HMDS. After drying the stent, sections of interest are cut and fixed on a microscope support with carbon glue. The sections are metallized and examined under a scanning electron microscope (Fig. 4C).

4. Discussion

The macrofluidic flow perfusion system described here enables an accurate and reliable assessment of the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents. One major advantage of this model is that it allows us to insert a flow chamber which can mimic any design and therefore reproduce any vascular territory of the human body eligible for stenting, including the carotid, femoral and coronary arteries. A summary of the advantages and disadvantages of our model as compared to pre-existing ones can be found in Table 4. Such a biomimetic chamber enables one to place a stent as it is inserted by a surgeon in a patient. Moreover, applying relevant flow rates in the chamber permits one to faithfully mimic the rheological conditions found in human arteries and should help to better evaluate the importance of rheology in stent thrombosis. In addition, use of pharmacological agents could help to assess the impact of currently used antiplatelet agents on thrombus formation on the stent struts and to define relevant drug concentrations to prevent stent-related thrombosis. This macrofluidic device could also be used to screen new drugs under development and thereby identify novel pharmacological strategies to prevent thrombus formation on stents.

As flow is a recognized major determinant of arterial thrombosis [22–24], our macrofluidic model can be employed to assess the importance of hemodynamics in the thrombogenicity of stents. Thus, by combining experimental flows with CFD around the stent wires, it is possible to precisely define the impact of local rheology on the thrombus formation occurring on the stent. In particular, a better understanding of the importance of the stent-induced flow perturbations triggering thrombosis will open up the possibility of developing novel stents that should be less thrombogenic. Such a device is therefore a relevant and cost-effective experimental model which should be of interest to companies working on new stents. The development of less thrombogenic stents could enable us to adapt therapeutic strategies to use less aggressive antiplatelet therapies and as a consequence, might reduce side effects such as hemorrhages.

Our macrofluidic flow system represents a very attractive platform to evaluate the thrombogenicity of stents under development. Indeed, the existing models present major limitations, notably because they do not reproduce the geometry of human vessels and

Table 4
Advantages and disadvantages of our model as compared to pre-existing ones.

Chandler loop system	<ul style="list-style-type: none"> • Advantages: permits one to evaluate multiple conditions simultaneously. The passive flow avoids the traumatizing effect of an active pumping system. • Disadvantages: does not allow the insertion of a chamber mimicking the geometry of a vessel, so the pathophysiological conditions found in patients are not faithfully reproduced. The partial filling of the loop creates a large air/fluid interface, which can induce major artefacts.
Annular perfusion chamber	<ul style="list-style-type: none"> • Advantage: the cylindrical design of the chamber allows the evaluation of stents under laminar blood flow. • Disadvantages: the chamber does not reproduce the geometry of arteries, thus poorly mimicking the clinical situation. The blood is in contact with the external and not the internal side of the stent.
Circular bench-top perfusion model	<ul style="list-style-type: none"> • Advantage: possibility of combining several systems and therefore testing various conditions at once. • Disadvantage: permits the insertion of a flow chamber but no study appears to have been performed.
Haemobile perfusion system	<ul style="list-style-type: none"> • Advantage: the rotating motor generates relevant flow rates. • Disadvantage: does not permit the insertion of a flow chamber.
Our closed circuit macrofluidic model	<ul style="list-style-type: none"> • Advantages: uses a chamber having the dimensions of human arteries. Allows the insertion of a commercial stent as in patients. Relevant rheological conditions can be employed. • Disadvantages: one experiment uses significant amounts of blood and reagent. The peristaltic pump does not reproduce the physiological pulsatile flow.

therefore do not mimic the hemodynamics in human arteries. The thrombogenic potential of new stents is often evaluated in large animal models such as pigs and sheep. Although large animals have the advantage of reproducing both primary and secondary hemostasis, they also entail some important limitations including ethical issues, the elevated costs of large animals and species differences linked to the hemostatic system. Hence the model proposed here represents an interesting screening device which could be applied before testing in animals.

While the design of the chambers described in this work mimics the geometry of healthy vessels based on dimensions reported in the literature, the method can also be used to reproduce diseased vessels since the fabrication relies on a 3D printed scaffold which can easily be adapted. Trying to mimic the topography of diseased vessels could help to better resolve the issues related to stent thrombosis in *in vitro* models and would thus represent an interesting step forward in our understanding of this harmful complication of angioplasty.

The use of living animals has a distinct advantage over *in vitro* flow systems since it better reproduces physiological conditions with the activation of coagulation. Moreover, if experiments are performed *ex vivo* (as in the arterio-venous shunt model), several tubes can be connected in parallel and therefore several conditions may be tested at once, which is not possible using our blood flow assay. However, the *in vitro* macrofluidic system we describe here has numerous advantages including the fact that it does not require a living animal, which is in line with the desired reduction and replacement of animals in scientific research. It is cost-effective as it can generate a useable amount of experimental results at relatively low cost. Another great advantage is that it uses human and not animal blood and therefore avoids species-specific results. Finally, an *in vitro* model allows one to precisely control numerous parameters in order to obtain similar conditions in all experiments.

4.1. Limitations of the model

Although the macrofluidic flow system described here is a new and remarkable model to investigate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents, it still has some limitations.

The first is the use of a peristaltic pump, which produces a semi-constant blood flow instead of a pulsatile flow. An upcoming development would be to use a pulsatile pump in order to better mimic the fluid dynamics in human vessels. This step remains challenging as even in microfluidic studies, the pulsatility is almost never taken into account by the investigators due to technical difficulties. Additionally, the use of connectors integrating more smoothly into the system would allow one to improve the flow transitions in the device.

Another limitation of the macrofluidic flow system is that the chambers do not mimic the rigidity of diseased vessels. It could be interesting to modify the fabrication of the chambers or employ other materials with different rigidity and study the impact on thrombus formation in the stents.

Moreover, the use of hirudinized whole blood does not allow us to evaluate the role of coagulation in thrombus formation on stents as the conditions are non-coagulant. To employ another anticoagulant as in recalcified citrated whole blood could be an interesting development in the close future, but this variant would be complex since coagulation permits thrombus formation throughout the system and could block the blood flow. In the future, lining of the chambers with endothelial cells might also be integrated into the models [25,26].

5. Conclusion

In summary, the model we describe here represents a powerful new platform to evaluate the thrombogenicity of clinically used stents and stents under development and opens up new perspectives to design novel and less thrombogenic stents.

Ethics declaration

This study was reviewed and approved by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675). All blood donors provided informed consent to participate in the study.

CRedit authorship contribution statement

Axelle Y. Kern: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Yevgeniy Kreinin:** Software, Methodology, Formal analysis. **Lise Charle:** Writing – original draft, Validation, Investigation, Formal analysis. **Mark Epshtein:** Software, Methodology, Conceptualization. **Netanel Korin:** Writing – review & editing, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Pierre H. Mangin:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Funding was provided by the ANR GESTE and the French Federation of Cardiology. The authors acknowledge the helpful support of the Electron Microscopy Team of UMR_S1255 in obtaining high resolution scanning electron microscope images.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26550>.

References

- [1] A. Lotfi, R. Reejhsinghani, Prevention of stent thrombosis: challenges and solutions, *VHRM* 11 (2015) 93–106, <https://doi.org/10.2147/VHRM.S43357>.
- [2] T.E. Watts, A. Chatterjee, M.A. Leesar, Stent thrombosis: early, late, and very late, in: *Cardiovascular Thrombus*, Academic Press, 2018, pp. 217–224.
- [3] J. Torrado, L. Buckley, A. Durán, P. Trujillo, S. Toldo, J. Valle Raleigh, A. Abbate, G. Biondi-Zoccai, L.A. Guzmán, Restenosis, stent thrombosis, and bleeding complications, *J. Am. Coll. Cardiol.* 71 (2018) 1676–1695, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.02.023>.
- [4] D.E. Cutlip, D.S. Baim, K.K.L. Ho, J.J. Popma, A.J. Lansky, D.J. Cohen, J.P. Carrozza, M.S. Chauhan, O. Rodriguez, R.E. Kuntz, Stent thrombosis in the modern era, *Circulation* 103 (2001) 1967–1971, <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.15.1967>.
- [5] R. Pop, I. Zinchenko, V. Quenardelle, D. Mihoc, M. Manisor, J.S. Richter, F. Severac, M. Simu, S. Chibbaro, O. Rouyer, et al., Predictors and clinical impact of delayed stent thrombosis after thrombectomy for acute stroke with tandem lesions, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* (2019), <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5976> ajnr; ajnr.A5976v1.
- [6] K. Katsanos, S.A.M. Al-Lamki, A. Parthipun, S. Spiliopoulos, S.D. Patel, I. Paraskevopoulos, H. Zayed, A. Diamantopoulos, Peripheral stent thrombosis leading to acute limb ischemia and major amputation: incidence and risk factors in the aortoiliac and femoropopliteal arteries, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 40 (2017) 351–359, <https://doi.org/10.1007/s00270-016-1513-0>.
- [7] A.J. Kirtane, G.W. Stone, How to minimize stent thrombosis, *Circulation* 124 (2011) 1283–1287, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.976829>.
- [8] I.H. Jaffer, J.C. Fredeburgh, J. Hirsh, J.I. Weitz, Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J. Thromb. Haemostasis* 13 (2015) S72–S81, <https://doi.org/10.1111/jth.12961>.
- [9] K. Kolandaivelu, R. Swaminathan, W.J. Gibson, V.B. Kolachalama, K.-L. Nguyen-Ehrenreich, V.L. Giddings, L. Coleman, G.K. Wong, E.R. Edelman, Stent thrombogenicity early in high-risk interventional settings is driven by stent design and deployment and protected by polymer-drug coatings, *Circulation* 123 (2011) 1400–1409, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.003210>.
- [10] M.U. Zafar, J.J. Bravo-Cordero, S. Torramade-Moix, G. Escolar, D. Jerez-Dolz, E.I. Lev, J.J. Badimon, Effects of electret coating technology on coronary stent thrombogenicity, *Platelets* 33 (2022) 312–319, <https://doi.org/10.1080/09537104.2021.1912313>.
- [11] J.A.R. Pfaff, C. Maurer, E. Broussalis, H. Janssen, R. Blanc, C. Dargazanli, V. Costalat, M. Piotin, F. Runck, A. Berlis, et al., Acute thromboses and occlusions of dual layer carotid stents in endovascular treatment of tandem occlusions, *J. NeuroIntervent. Surg.* 12 (2020) 33–37, <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2019-015032>.
- [12] U. Yilmaz, H. Körner, R. Mühl-Benninghaus, A. Simgen, C. Kraus, S. Walter, S. Behnke, K. Faßbender, W. Reith, M.M. Unger, Acute occlusions of dual-layer carotid stents after endovascular emergency treatment of tandem lesions, *Stroke* 48 (2017) 2171–2175, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015965>.
- [13] T. Klail, C. Kurmann, J. Kaesmacher, A. Mujanovic, E.I. Piechowiak, T. Dobrocky, S. Pilgram-Pastor, A. Scutelnic, M.R. Heldner, J. Gralla, et al., Safety and efficacy of carotid artery stenting with the CGuard double-layer stent in acute ischemic stroke, *Clin. Neuroradiol.* 33 (2023) 237–244, <https://doi.org/10.1007/s00062-022-01209-3>.
- [14] A.B. Chandler, In vitro thrombotic coagulation of the blood; a method for producing a thrombus, *Lab. Invest.* 7 (1958) 110–114.
- [15] K.S. Sakariassen, P.A. Aarts, P.G. de Groot, W.P. Houdijk, J.J. Sixma, A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components, *Lab. J. Clin. Med.* 102 (1983) 522–535.
- [16] C. Beythien, W. Terres, C.W. Hamm, In vitro model to test the thrombogenicity of coronary stents, *Thromb. Res.* 75 (1994) 581–590, [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(94\)90170-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(94)90170-8).
- [17] G.E. Engels, S.L.J. Blok, W. van Oeveren, In vitro blood flow model with physiological wall shear stress for hemocompatibility testing—an example of coronary stent testing, *Biointerphases* 11 (2016) 031004, <https://doi.org/10.1116/1.4958979>.
- [18] G. Tepe, J. Schmehl, H. P. Wendel, S. Schaffner, S. Heller, M. Gianotti, C. D Claussen, S. H Duda, Reduced thrombogenicity of nitinol stents—in vitro evaluation of different surface modifications and coatings, *Biomaterials* 27 (2006) 643–650, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.004>.
- [19] H. Wieneke, C. von Birgelen, M. Haude, H. Eggebrecht, S. Möhlenkamp, A. Schmermund, D. Böse, C. Altmann, T. Bartel, R. Erbel, Determinants of coronary blood flow in humans: quantification by intracoronary Doppler and ultrasound, *J. Appl. Physiol.* 98 (2005) 1076–1082, <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00724.2004>.
- [20] H.-L. Liang, Doppler flow measurement of lower extremity arteries adjusted by pulsatility index, *Am. J. Roentgenol.* 214 (2020) 10–17, <https://doi.org/10.2214/AJR.19.21280>.
- [21] A. Benetos, A. Simon, J. Levenson, P. Lagneau, J. Bouthier, M. Safar, Pulsed Doppler: an evaluation of diameter, blood velocity and blood flow of the common carotid artery in patients with isolated unilateral stenosis of the internal carotid artery, *Stroke* 16 (1985) 969–972, <https://doi.org/10.1161/01.STR.16.6.969>.
- [22] W.S. Nesbitt, P. Mangin, H.H. Salem, S.P. Jackson, The impact of blood rheology on the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis, *J. Mol. Med.* 84 (2006) 989–995, <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0101-1>.
- [23] W.S. Nesbitt, E. Westein, F.J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, S.P. Jackson, A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation, *Nat. Med.* 15 (2009) 665–673, <https://doi.org/10.1038/nm.1955>.
- [24] M.H. Kroll, J.D. Hellums, Platelets and shear stress, *Blood* 88 (1996) 1525–1541, <https://doi.org/10.1182/blood.V88.5.1525.1525>.
- [25] M. Houry, M. Epshtein, H. Zidan, H. Zukerman, N. Korin, Mapping deposition of particles in reconstructed models of human arteries, *J. Contr. Release* 318 (2020) 78–85, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.004>.
- [26] M. Houry, M. Epshtein, N. Korin, In vitro 3D cell-cultured arterial models for studying vascular drug targeting under flow, *J. Vis. Exp.* 14 (2021), <https://doi.org/10.3791/62279>.

Conclusion

Ce manuscrit décrit un nouveau système de perfusion macrofluidique basé sur l'utilisation de chambres aux dimensions et à la géométrie d'artères humaines d'intérêt, comme la carotide, la fémorale et les coronaires. Le système de perfusion macrofluidique fournit une évaluation précise et fiable de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. L'un des principaux avantages de ce modèle par rapport à ceux retrouvés dans la littérature est qu'il permet d'insérer une chambre qui peut imiter n'importe quel vaisseau humain et dans laquelle des stents utilisés en clinique sont introduits, reproduisant ainsi des conditions d'écoulement pertinentes. Toutefois, le dispositif nécessite de grands volumes de sang et de réactifs pour un flux et la pompe péristaltique ne reproduit pas le flux pulsatile.

Ce système peut être utile pour évaluer les stents en cours de développement afin de déterminer les moins thrombogènes. Il évalue également chaque paramètre du stent (matériaux, design, coating) séparément afin de développer un stent le moins thrombogène possible, facilitant éventuellement l'adaptation des stratégies thérapeutiques en utilisant des thérapies antiplaquettaires moins agressives et, par conséquent, de réduire les effets secondaires tels que les hémorragies. Enfin, ce modèle ouvre aussi la possibilité d'étudier la thrombose de stent en combinant ses deux déterminants, à savoir un coating à la plaque d'athérosclérose sur lequel serait placé un stent.

L'environnement joue un rôle majeur dans la thrombose de stent carotidien chez les patients présentant une lésion en tandem

Publication 3 :

**« High shear environment precipitates carotid stent thrombosis
in patients with tandem lesions »**

Axelle Y. Kern¹, Yevgeniy Kreinin², Lise Charle¹, Camille Robert¹, Mark Ephstein², Agnese Luccheti³, Caroline Emonts³, Tim Bolle³, Nabil Chakfé^{4,5}, Raoul Pop^{1,6}, Netanel Korin^{2*}, Pierre H. Mangin^{1*}

¹University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR_S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel; ³Institut für Textiltechnik of RWTH Aachen University, Otto-Blumenthal-Straße 1, 52074 Aachen, Germany; ⁴Vascular Surgery and Renal Transplantation Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France; ⁵GEPROMED, Strasbourg, France; ⁶Interventional Neuroradiology Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

* Co-last authors

Soumis, Advanced Sciences.

Introduction

Les patients victimes d'une lésion en tandem présentent un AVC ischémique dont l'origine de l'embolie occlusif provient d'une thrombose qui se forme à la suite de la rupture d'une plaque d'athérosclérose dans la carotide. Le traitement de ces patients repose d'une part sur une thrombectomie et/ou une thrombolyse pour recanaliser l'artère cérébrale bouchée, et d'autre part sur le placement d'un stent au niveau de la carotide afin d'éviter une récurrence. La complication la plus sévère du stenting est la thrombose de stent, qui présente un taux de morbi-mortalité très élevé, notamment dans ce groupe de patients, avec une incidence moyenne autour de 20 %. Les deux déterminants de la thrombose de stent sont la plaque d'athérosclérose sur laquelle le stent est implanté, et le stent en lui-même. Une compréhension approfondie de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique est cruciale pour développer des stents moins thrombogènes et améliorer la prise en charge des patients victimes d'un AVC en tandem.

L'objectif de mon troisième article de thèse a consisté à évaluer la thrombogénicité intrinsèque des stents carotidiens placés au niveau de la bifurcation carotidienne, en utilisant le modèle macrofluidique décrit précédemment. J'ai tout d'abord caractérisé le système de perfusion et les chambres macrofluidiques, notamment en évaluant la réponse des plaquettes à différents agonistes en agrégométrie et en m'assurant que les plaquettes n'adhèrent à la paroi de la chambre que lorsque des protéines adhésives sont déposées dessus. J'ai ensuite implanté deux stents carotidiens utilisés en clinique, le Casper et le Wallstent, qui présentent des caractéristiques différentes, afin d'évaluer leur thrombogénicité intrinsèque. J'ai aussi cherché à corrélérer les résultats observés à ceux obtenus chez les patients, afin de m'assurer que mon modèle et mes observations ont une pertinence clinique. Je me suis également intéressée aux mécanismes par lesquels les plaquettes adhèrent et agrègent au stent en utilisant différents agents pharmacologiques. Enfin, nous avons conçu de nouveaux stents qui pourraient concourir à réduire la thrombogénicité intrinsèque des stents et les avons évalués dans le dispositif macrofluidique afin de déterminer s'ils avaient le potentiel de représenter un avantage pour les patients.

Ce travail, pour lequel je signe premier auteur, a été soumis courant 2024 dans le journal *Advanced Sciences*.

A high shear environment promotes acute carotid stent thrombosis in patients with tandem lesions

Axelle Y. Kern¹, Yevgeniy Kreinin², Lise Charle¹, Camille Robert¹, Mark Epshtein², Agnese Lucchetti³, Caroline Emonts³, Tim Bolle³, Thomas Gries³, Nabil Chakfé^{4,5}, Raoul Pop^{1,6}, Netanel Korin^{2*}, Pierre H. Mangin^{1*}

¹University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR_S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel; ³Institut für Textiltechnik of RWTH Aachen University, Otto-Blumenthal-Straße 1, 52074 Aachen, Germany; ⁴Vascular Surgery and Renal Transplantation Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France; ⁵GEPROMED, Strasbourg, France; ⁶Interventional Neuroradiology Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

* Co-last authors

Short title: Stents in the carotid bifurcation promote high shear-dependent thrombosis

Text word count: 4,639

Abstract word count: 231

Number of figures: 6

Number of table: 1

Number of references: 48

Correspondence to: Pierre Mangin, UMR_S1255, EFS-Grand Est, 10 rue Spielmann, F-67065
Strasbourg Cedex, France; Tel: (33) 388 21 25 25; Fax: (33) 388 21 25 21; E-mail:
pierre.mangin@efs.sante.fr

Key Points:

- Patients with tandem lesions present massive thrombosis in the carotid bifurcation.
- Development of a relevant macrofluidic model to study the thrombogenicity of stents.
- Clinically used carotid stents are highly thrombogenic *per se*.
- Stents generate a thrombogenic high shear environment in the lumen of the carotid.
- The macrofluidic model has the potential to reduce testing in large animal models.

ABSTRACT

Background: Stent thrombosis is a very serious complication of angioplasty with stenting, as evidenced by the associated morbi-mortality events. Its incidence is particularly elevated after emergent carotid stenting in acute ischemic stroke patients, reaching 20 %. **Objectives:** A better understanding of the mechanisms driving stent thrombosis will open up new avenues to limit this alarming complication. Its two main determinants are the ruptured atherosclerotic plaque and the stent itself, whose particular role in the process remains unknown. **Methods:** Using a new macrofluidic model mimicking the geometry of the human carotid artery, the intrinsic thrombogenicity of carotid stents was evaluated. **Results:** Real-time video microscopy combined with scanning electron microscopy revealed that two widely used commercial stents are thrombogenic and promote the formation of a massive thrombus in the carotid bifurcation. This result was consistent with a retrospective clinical study in stented patients presenting a tandem lesion. Moreover, a stent lying in the carotid bifurcation of the macrofluidic model generated a prothrombotic high shear environment, triggering thrombosis, which was prevented in the presence of aspirin or abciximab. Finally, stents with a new design could avoid the formation of large thrombi in the carotid bifurcation, opening up the perspective of new ways to prevent carotid stent thrombosis. **Conclusions:** Stents placed inside the carotid bifurcation are responsible for a massive thrombus formation that could lead to stent thrombosis. The absence of mesh prevents its formation.

Key words: macrofluidic system, carotid stent, stent thrombogenicity, carotid bifurcation

INTRODUCTION

Platelets play a major role in arterial thrombosis through their ability to adhere, activate and aggregate at sites of atherosclerotic plaque rupture in a diseased artery. Platelet thrombi can become occlusive and result in life-threatening ischemic pathologies such as myocardial infarction or ischemic stroke [1]. Blood flow is well known to regulate many aspects of platelet function including their adhesion, activation and aggregation at sites of vessel injury during hemostasis [2]. The flow disturbances appearing in a diseased vessel are also known to be a major factor triggering arterial thrombosis [2]. Indeed, an evolved atherosclerotic plaque profoundly modifies the local geometry and generates altered blood flows which are highly thrombogenic [3]. Shear gradients and elongational flows occurring in the post-stenotic area facilitate the unfolding of von Willebrand factor (vWF) and thereby hasten a process of enhanced thrombus growth [4]. In addition, the high shear found in the stenosis throat can likewise exceed the levels required for vWF unfolding and trigger platelet aggregation. Finally, flows are deeply modified in the post-stenotic region, with low shear pockets, eddies and regions of recirculation, all of which are strongly thrombogenic [3].

Antiplatelet agents are the cornerstone of the treatment of arterial thrombosis. The current standard of care relies on dual antiplatelet therapy (DAPT) which combines aspirin and a P2Y₁₂ receptor inhibitor and aims at limiting platelet activation [5]. Aspirin irreversibly inhibits cyclooxygenase (COX) 1 to prevent the synthesis of thromboxane A₂ (TxA₂), a strong platelet agonist, while P2Y₁₂ antagonists such as clopidogrel or prasugrel impair adenosine-5'-diphosphate (ADP)-mediated platelet activation. A third class of antiplatelet drugs, namely integrin α IIb β 3 blockers, directly impair platelet aggregation. Despite the high efficiency of these agents, their use is limited to acute events as they entail a high risk of hemorrhage [5].

In ischemic stroke patients, the standard pharmacological approach relies on thrombolysis, notably with recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), to dissolve an intracranial clot. Since 2015, in eligible patients, endovascular thrombectomy is used to mechanically remove the intracranial clot [6]. Nevertheless, 15 to 20 % of ischemic stroke patients present ongoing carotid stenosis or occlusion, a so-called tandem lesion, which requires implantation of a stent to limit the risk of embolization and stroke recurrence [7,8]. A major drawback of this procedure is acute stent thrombosis (ST), which is an independent predictor of an unfavorable neurological outcome [8–10]. Moreover, recent reports suggest that the incidence of ST is very elevated following emergent carotid stenting during stroke thrombectomy, with an occurrence of 8.8 to 28.2 %, confirming that it represents a major health issue, with very limited options for efficient treatment [8,10–13]. A thorough understanding of the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents is crucial to develop less thrombogenic stents and ultimately to improve the management of stroke patients.

In this study, we applied an original and relevant macrofluidic model to the in-depth characterization of the thrombogenicity of clinically used carotid stents [14]. We combined an experimental approach using the macrofluidic device with a computational fluid dynamics (CFD) analysis to precisely define the rheological conditions triggering thrombosis in a stent in the carotid bifurcation. Our results were confirmed by a retrospective clinical study in patients with tandem lesions, showing a massive thrombus occurring in the bifurcation. Finally, we propose an alternative stent design as a solution to limit the formation of a large thrombus in the carotid bifurcation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The software Autodesk Fusion 360 was from Autodesk Inc. (San Rafael, CA, USA). The 3D printer Photon S and its UV resin were from Anycubic (Ginsheim-Gustavsburg, Germany), the 3D printer Form 3B+ and its UV resin from Formlabs GmbH (Berlin, Germany). Varnish was from Rust-oleum (Herblay-sur-Seine, France), acrylic mastic from Würth (Erstein, France) and silicone elastomer Elastosil RT601 A/B from Wacker Chimie SAS (Lyon, France). Absolute ethanol and acetone were from vWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France) and recombinant hirudin was from Transgene (Illkirch-Graffenstaden, France). ADP, fatty acid-free human serum albumin (HSA), calcium chloride (CaCl₂), magnesium chloride (MgCl₂) and hexamethyl-1,1,1,3,3,3-disilazane (HMDS) were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Collagen was from Takeda (Horm, Linz, Austria), DiOC₆ (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) from Molecular Probes (Paisley, United Kingdom) and Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) from ThermoFisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). The peristaltic pump 530U/R and pumpsil tubulars and connectors were from Watson-Marlow (La-Queue-Les-Yvelines, France). The Leica Z16 APO microscope was from Leica Microsystems (Nanterre, France), the ARACT 4004 aggregometer from ELITechGroup (Puteaux, France) and the platelet counter Sysmex XN-1000 from Sysmex France (Roissy, France). Casper carotid artery stents were from Microvention France (Saint-Germain-en-Laye, France) and Wallstents from Boston Scientific SAS (Voisins-le-Bretonneux, France). Glutaraldehyde was from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, Pennsylvania, USA). The University Hospital of Strasbourg supplied abciximab (ReoPro) and aspirin.

Blood donation

In order to be eligible for the trial, donors had to be volunteer healthy adults between 18 and 70 years old. They were unpaid for the trial and donation. They were recruited and screened according to institutional guidelines from the French Blood Institute (Etablissement Français du Sang) and the in-force french regulations relative to blood donors' selection. They had to be free of anti-platelet drugs intake, for at least 10 days for aspirin and 3 days for non-steroid anti-inflammatory drugs. They were orally and writtenly informed of the partial or total use of their blood donation for research purposes, and signed an informed consent form before starting the trial.

Blood (45 mL) was collected into a Falcon tube containing hirudin (5 mL, final concentration: 100 U/mL) and kept at 37°C. The first few milliliters of blood were discarded to avoid platelet activation.

Fabrication of the carotid artery chamber

The chamber was modeled based on the average dimensions of a human carotid artery [15–18]. A RT601 silicon model was produced as previously described [14,19,20].

Perfusion of blood through a collagen-coated chamber

A collagen suspension (500 μ L containing 200 μ g/mL) was deposited in the internal carotid chamber, which was left for 1 h at room temperature. The chamber was then passivated with 1 % HSA (3 mL) for 30 min at room temperature and rinsed with PBS supplemented with CaCl₂ (2 mmol/L) and MgCl₂ (1 mmol/L). Human whole blood (200 mL) collected into hirudin (100 U/mL) was perfused for 60 min through the macrofluidic flow chamber in a closed circuit

at 37 °C using a peristaltic pump. The macrofluidic model has already been described previously [14].

Flow experiments in the macrofluidic flow chamber

Stents (commercial or developed for us) were deployed in the flow chamber at a similar position as in patients presenting carotid thrombosis, *i.e.*, in the common carotid, the carotid bulb and the internal carotid, using a catheter allowing self-expansion of the stent. The flow system, composed of tubing, connectors, a peristaltic pump and the chamber, was assembled and installed and the blood reservoir placed in a water bath at 37 °C. The system was primed with PBS 1X to remove air bubbles and check for the absence of leaks. Human whole blood collected into hirudin (100 U/mL) and incubated with DiOC₆ (1 µmol/L) to label platelets was then perfused at 380 mL/min (mean flow rate and wall shear rate (WSR) in the human carotid) through the circuit for one hour. Platelet adhesion and thrombus formation were visualized in real time using a fluorescence microscope.

Platelet aggregation

Blood perfused through the macrofluidic flow system was collected at different time points and centrifuged at 250 g for 16 min to obtain platelet-rich plasma (PRP). PRP was stored in a water bath at 37°C for 30 min before initiating aggregation with exogenous agonists (5 µmol/L ADP or 2.5 µg/mL collagen) and measuring the variation in light transmission over time.

Scanning electron microscopy

Stents were fixed for one hour with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3, 305 mOsm) containing 2 % sucrose. They were then washed twice with distilled water

and the adherent platelets were dehydrated in graded ethanol solutions. After replacement of ethanol by HMDS, the samples were air-dried, sputtered with platinum and examined under a Hitachi scanning electron microscope (Tokyo, Japan) [21].

Retrospective review of patients

The retrospective study of patients treated with angioplasty for a tandem lesion at the University Hospital of Strasbourg (Strasbourg, France) included 147 patients included between 2012 and 2022. The angiography images were defined in four areas: the internal carotid, the bifurcation, the external carotid and the common carotid. Stent thrombosis was detected at the discretion of the practitioner.

Computational fluid dynamics

Computational fluid dynamics (CFD) simulations were used to investigate the shear stress and flow patterns in a native (*i.e.*, non-stented) carotid bifurcation as compared to a stented bifurcation. Two stents were considered, namely the Casper stent and the Wallstent, which were also analyzed in a straight vessel. The stents and vessels were modeled using SolidWorks CAD software. For the carotid, we employed the CAD microfluidic chamber model. The straight vessel was designed to mimic a 6 mm diameter in the carotid. The dual-layered Casper stent was modeled with an 8 mm diameter, a 30 mm length, a 120 μm outer wire and 30 μm base. The single-layered Wallstent featured a diameter of 8 mm, a length of 29 mm and a wire diameter of 120 μm . A braiding angle of 50 degrees was applied in both stents [22]. The simulation geometries were designed with the stents reconstructed within the carotid model to conform to the vessel lumen. First, the stents models were positioned to be aligned concentrically with the carotid inlet vessel. Following this step, the stent was bended and

oriented to align with the internal carotid artery via using the software Blender[®]. To simplify the mesh and CFD analysis, the area where the stent obstructs blood flow to the external carotid artery was retained, while the remaining stent geometry was removed. The models were meshed and the flow was simulated using OpenFOAM. All other models were meshed using ANSYS GAMBIT 21 R2 and the simulations were conducted using ANSYS Fluent 21 R2. The element type used as well as the final number of elements constituting the different meshes are listed in **Table 1**. The flow simulation conditions were chosen to be a constant laminar incompressible flow. Newtonian rheology was assumed due the existing arterial strain rates where Newtonian behavior dominates and as widely used in carotid bifurcation simulations [20,23,24]. The average flow rate was taken to be 380 mL/min and the dynamic viscosity and density of blood to be 3.5×10^{-3} Pa/s and $\rho = 1080$ kg/m³, respectively. Gravitational forces were assumed to be negligible [20,25] and the model was assumed to be rigid [24].

Table 1: Mesh types and numbers of elements

Geometry	Mesh type	Number of elements
Carotid	Tetrahedral, Prism	1,000,000
Casper stent in carotid	Tetrahedral, Prism	24,000,000
Wallstent in carotid	Tetrahedral, Prism	48,000,000

Development of an alternative stent design limiting thrombus formation

Stents with an opening to be placed facing the carotid bifurcation were produced using the hexagonal braiding machine of the Institut für Textiltechnik of RWTH Aachen University (Aachen, Germany). A detailed description of the braiding process can be found elsewhere [26]. The stents had a diameter of 8 mm, a length of 40 mm and a 10 mm diameter opening

in the center of the stent. They consisted of 24 nitinol wires (Fort Wayne Metals Research Products, LLC, Indiana, USA) with a diameter of 100 μm , braided in a one-over-one-under pattern. The braiding angle was about 58°. The stent units obtained were heat set in an oven at 600 °C for 20 min and then left to cool at room temperature. After fabrication, the units were cleaned in an ultrasonic bath, immersed in ethanol and finally dried. Braided stents with the same parameters but without the opening were also produced as controls.

Statistics

Results are expressed as the mean \pm the standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). Statistical significance between two groups was evaluated with the Mann-Whitney test or Student's t-test, according to the Gaussian law observed, while statistical significance between several different groups was evaluated with the Kruskal-Wallis test. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). The outliers in Figures 4A, 4D and 6E were determined using Grubb's test.

RESULTS

Development and characterization of a novel and relevant macrofluidic model mimicking the human carotid artery. Based on a 3D-printed scaffold, we developed a flow chamber made of elastosil which reproduces the exact anatomy of the adult human carotid bifurcation, comprising the regions of the common, internal and external carotids (**Figures 1A, B**). Computational fluid dynamics (CFD) showed that flow disturbances accompanied by regions of low WSR occurred at the entrance to the internal carotid artery (**Figure 1C**), which is very similar to what has been reported in patients [27–29]. The macrofluidic chamber was inserted

into a closed flow system through which human whole blood was perfused at 380 mL/min, reproducing the average physiological WSR in the human carotid (**Figure 1D**) [30]. Using a Born-type aggregometer, we established that perfusion of blood through the macrofluidic device for up to one hour caused no alteration in the functional responses of platelets, as they aggregated normally in response to collagen (2.5 µg/mL) (**Figures 1E, F**) and ADP (5 µmol/L) (**Supplemental Figure 1**). We next perfused whole blood incubated with DiOC₆ through a chamber in which the internal carotid region had been coated with type I fibrillar collagen (200 µg/mL). Platelets labeled with DiOC₆ accumulated exclusively on the collagen coating, no specific signal being detected in the uncoated regions passivated with HSA, within the same chamber or in a control chamber (control: $0.4 \pm 0.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; collagen: $261.6 \pm 1.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0001$) (**Figures 1G, H**). Scanning electron microscopy (SEM) confirmed the formation of very large thrombi composed of tightly packed platelets (**Figure 1I**). Altogether, these results validated the macrofluidic system as a model well adapted to study real-time platelet adhesion and aggregation under hemodynamic conditions relevant to the carotid artery.

The carotid bifurcation is a preferential site of thrombus formation on stents. To evaluate the thrombogenicity of commercial stents, we implanted them in the common and internal carotid regions of our macrofluidic chamber, specifically designed to reproduce the geometry of the human carotid artery (**Figure 2A**). We tested two different types of stent, a Casper stent and a Wallstent, which differ in their geometry and material, being respectively a dual-layered nitinol stent and a single-layered elgiloy stent (**Figure 2B**). Perfusion of hirudinized human whole blood incubated with DiOC₆ led to the appearance of a fluorescent signal, which was restricted to the stented areas. This signal seemed to be specific as no fluorescence was detected in non-stented chambers or in regions where no stent had been implanted. We

observed a diffuse signal outlining the stent and very strong fluorescence in the bifurcation area, suggesting the formation of a massive thrombus several millimeters long (**Figure 2C**). Quantification of adherent platelets indicated that large thrombi formed in both Casper stents and Wallstents (control: $0.18 \pm 0.16 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Casper: $14 \pm 4.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Wallstent: $13.2 \pm 6.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0005$) (**Figure 2D**). The average thrombus size was 200 times bigger than classical thrombi observed on immobilized collagen in microfluidic chips. SEM showed that the thrombi were compact and composed of tightly packed platelets which had contracted and extended filipodia (**Figure 2E**), pointing to a high level of activation. These findings indicated that both types of carotid stent extensively used in clinical practice, the Casper stent and the Wallstent, are intrinsically thrombogenic and promote the formation of a massive thrombus in the carotid bifurcation.

Large thrombi form on stents in the carotid bifurcation of patients with tandem lesions. To determine whether our experimental observations in the carotid bifurcation had clinical relevance, we performed a retrospective study on 147 stroke patients with tandem lesions who underwent emergent carotid stenting at the University Hospital of Strasbourg. Among these 147 patients, 31 (21.1%) presented ST, which is in agreement with other reports describing the incidence of ST in patients with tandem lesions to range from 8.1 to 28.2 % [8,10–13] (**Figure 3A**). As expected, all patients with ST presented a thrombus in the internal carotid, as this is a particularly thrombogenic region where the injured atherosclerotic plaque is located (**Figures 3B, C**) [31]. Interestingly, we found that 12 (38.7 %) of the 31 patients with ST displayed thrombi in the carotid bifurcation (**Figures 3B, C**). This represents an unexpectedly high value considering that this area is devoid of any thrombogenic atherosclerotic plaque. Thus, this result confirms our *in vitro* observation and indicates that

the presence of a stent in the carotid bifurcation generates a hot spot of thrombosis, which has clinical relevance.

Characterization of the thrombogenic flows generated by stents in the carotid bifurcation using computational fluid dynamics. To gain insight into the nature of the blood flow in a stented chamber in the region of hot spot thrombosis, we used a CFD approach. We modeled the Casper stent and Wallstent configurations and placed them in the carotid bifurcation (**Figure 4A**). Using CFD, we examined the blood velocities and WSR produced in the stents. The results showed that in the areas where the blood flows rapidly through the stent towards the internal carotid, the WSR at the stent walls are abnormally high and can exceed $10,000 \text{ s}^{-1}$. Furthermore, we found that the Casper stent generated higher shear rates near the bifurcation, whereas in the Wallstent the shear rate was more diffuse around the external carotid entrance while still reaching elevated levels near the bifurcation (**Figures 4B, C**). Such elevated WSR and flow conditions are usually associated with high shear thrombosis [32,33]. These pathological levels of shear and flow impingement leading to high shear thrombosis also agree well with experimental and clinical results showing the rapid formation of large thrombi at these sites.

Aspirin and abciximab efficiently prevent the formation of a large thrombus in a stent in the carotid bifurcation. To prevent ST in patients with tandem lesions undergoing angioplasty, the current standard of care is aspirin. We found that platelet accumulation in a stent in the carotid bifurcation was efficiently reduced in the presence of aspirin for both Casper stents (control: $29.9 \pm 5.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; aspirin: $8.1 \pm 3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0036$) and Wallstents (control: $21.3 \pm 6.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; aspirin: $9.3 \pm 2.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p > 0.05$) (**Figures 5A, B**). This indicated that

aspirin prevents the formation of large thrombi directly in the stent. Similar results were obtained with abciximab, which targets integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Indeed, a profound impairment of platelet accumulation in the bifurcation was observed in Casper stents (control: $14 \pm 2.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; abciximab: $3.4 \pm 1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0018$) and Wallstents (control: $19.6 \pm 6.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; abciximab: $2.5 \pm 1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0111$) (**Figures 5C, D**). We could conclude from these results that the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and TxA2 pathways play a major role in platelet adhesion and aggregation in both Casper stents and Wallstents.

New stent design with an opening to avoid thrombus formation in the carotid bifurcation.

The main finding of our study was the formation of a massive thrombus in stents lying in the bifurcation of the carotid artery, both in a relevant experimental macrofluidic model and in patients. This suggested that developing a stent with an opening to avoid the presence of stent wires in the bifurcation might represent an interesting strategy to prevent ST. To test our hypothesis, we constructed two nitinol wire braided stents, one of them having an opening in its center (open stent) to be placed facing the lumen of the external carotid artery and the other fully braided (full stent) (**Figure 6A**). Perfusion of hirudinized human whole blood through stented flow chambers confirmed the occurrence of a thrombus in the bifurcation of the full stent (**Figure 6B**). We found that the full stent was nevertheless less thrombogenic than the Casper stent, as it did not always lead to thrombus formation in the bifurcation (**Figure 6C**). This might at least partially mimic the clinical situation whereby thrombosis does not occur in all patients. Quantification of platelet adhesion showed that the full stent was much more thrombogenic than the open stent (full stent: $11.3 \pm 2.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; open stent: $2.1 \pm 0.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0286$) (**Figures 6D, E**). It was thus possible to design a stent with an opening in its center having the potential to avoid formation of a thrombus in the carotid

bifurcation. This form of stent could represent a new therapeutic solution to limit ST in patients with tandem lesion.

DISCUSSION

In this work, we developed and characterized the first macrofluidic model closely mimicking the geometry of the human carotid artery and ideally suited to study the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents. We provide evidence that two stents widely used in clinical practice, namely the Casper stent and the Wallstent, are thrombogenic, as they trigger formation of a massive white thrombus in the carotid bifurcation. This observation is clinically relevant as an important number of patients suffering from ST present a thrombus in the bifurcation of their carotid stent. One major cause of this thrombosis is the high shear environment engendered by the stent lying in the lumen of the bifurcation. Thrombus formation in stents was found to be sensitive to aspirin and $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin blockers. We also designed a new form of stent adapted to the carotid, which avoids generation of a large thrombus in the bifurcation. This represents a potential solution to limit ST in tandem lesion patients undergoing angioplasty with stenting.

Our experimental model allows one to study the intrinsic thrombogenicity of clinical stents and stents under development. As compared to existing models such as the Chandler loop, the annular perfusion chamber or the Haemobile perfusion system, our macrofluidic device has the advantage of incorporating a flow chamber with the exact dimensions of the human carotid artery [34–36]. Our system marks a step forward towards the development of a biomimetic device. Firstly, it allows the insertion of a stent as it is done in clinical practice by a neuroradiologist. Secondly, the specific geometry of the chamber permits the placement of a stent extending from the common carotid to the internal carotid similarly as in patients.

Such relevant positioning of the stent allows one to mimic the rheological conditions found in stented patients with a tandem lesion. This is of crucial importance, as it is well known that rheology is a key regulator of platelet function and a major trigger of arterial thrombosis [2,3,37]. Thus, reproducing the pathophysiological flow conditions *in vitro* enables us to investigate ST in a more relevant way. The 3D-printed scaffolds to cast the chamber can be easily generated, so that one may envisage producing flow chambers mimicking any type of human vessel. This opens up the possibility of studying ST in any vessel including the femoral or coronary arteries and assessing the intrinsic thrombogenicity of stents implanted in all vascular territories.

The materials used to make medical implants are known to trigger a biological response and to represent a major source of unwanted side effects [38–40]. This is also true for the materials composing stents, which support platelet adhesion and activation and promote thrombus formation [41–43]. The stent surface can also activate the contact pathway and facilitate coagulation, which generates thrombin, the most potent platelet agonist and a major trigger of arterial thrombosis [41]. Our results confirm that platelets adhere, become activated and aggregate on artificial surfaces such as nitinol and elgiloy, indicating that both these materials are thrombogenic in nature. These results also show that our model is particularly well suited to evaluate the thrombogenicity of current and newly developed clinical stents. In addition, the macrofluidic device could represent an attractive platform to screen new stent materials under development, allowing evaluation of their blood compatibility and thrombogenicity. Finally, it could also be used to assess the impact of original surface treatments or new stent coatings, like antiplatelet agents, which further highlights the potential of such a model for the development of new stents. The flow device

described here could be employed for preclinical screening before experiments in large animals like pigs or sheep and therefore presents an obvious ethical advantage.

While it is evident that the material is a major cause of the intrinsic thrombogenicity of stents and hence of ST, our study highlights the importance of the stent design. We demonstrate that the main reason why the design can be deleterious is its ability to modify local flow around the wires and to generate disturbed prothrombotic flows. Thus, we provide solid evidence that a stent lying in the lumen of the carotid artery is highly thrombogenic due to the generation of a high shear region. Moreover, it is well documented that elevated WSR exceeding $5,000 \text{ s}^{-1}$, like those encountered in stents implanted in the carotid bifurcation, are strongly prothrombotic, notably through their potential to unfold vWF [37]. This exposes a cryptic binding site for the platelet receptor GPIIb, thereby initiating thrombosis. In summary, our results emphasize that in addition to the material, the form of the stent and its impact on rheology should be investigated in more detail in order to limit ST. One may also use CFD to identify forms which should be less prone to trigger a thrombotic response.

To prevent the occurrence of a thrombus at the carotid bifurcation, we developed a new single-layered nitinol stent with (open stent) or without (full stent) a hole in its center, to be placed in the bifurcation. The full stent allowed the formation of a large thrombus at the bifurcation, approaching those found in the Casper stent or the Wallstent. However, while the Casper stent generated a thrombus in almost all experiments performed, the full stent and the Wallstent were less thrombogenic. This disparity cannot be explained by the material, since the Casper stent is made of the same metal as the full stent, *i.e.* nitinol, whereas the Wallstent is made of elgiloy. A possible explanation for the difference in thrombogenicity might be the material structure, as the Casper stent is dual-layered while the other two stents are mono-layered. This hypothesis is corroborated by studies showing that dual-layered stents

are generally more thrombogenic, although these reports do not indicate where the thrombus formation occurs [44–47].

We also observed that use of aspirin efficiently reduced thrombus formation in our macrofluidic model, which is in agreement with clinical practice, where aspirin is the current standard of care to prevent ST [48]. Nevertheless, it should be mentioned that around 20 % of patients treated with aspirin still develop ST [8,11] and that alternative strategies are needed. Our device offers the possibility of testing other pharmacological agents to define more effective pharmacological strategies for the benefit of patients.

In conclusion, we have developed and characterized a macrofluidic model with a flow chamber mimicking the human carotid artery, which is suitable to evaluate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents. We observed formation of a massive thrombus in the carotid bifurcation, which appears to be relevant to pathophysiology, since about 40 % of patients with ST present a thrombus in this region. The main trigger of this thrombotic event was found to be the high shear generated by the stent wires lying in the lumen of the bifurcation. We also propose a new type of stent designed to avoid formation of a thrombus in the carotid bifurcation. The macrofluidic device described in this study has the potential to allow one to assess the intrinsic thrombogenicity of a wide variety of stents, to appraise new designs and surface treatments or coatings aimed at reducing their thrombogenicity.

ETHICS

This study was approved by the French Ethics Committee of Est II (Ref: 23.02086.000212; n° ID-RCB: 2023-A01318-37) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

This study involved human participants in the retrospective review, but an ethics committee review was not mandatory according to local legislation and signed informed consent was

waived. The retrospective review of anonymized clinical data was performed in accordance with current clinical practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by ANR GESTE and the French Federation of Cardiology. The authors acknowledge the helpful support of the Electron Microscopy Team of UMR_S1255 in obtaining high-resolution scanning electron microscope images. They would also like to thank the University Hospital of Strasbourg for supplying abciximab and aspirin.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors have no competing interests to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

BIBLIOGRAPHY

1. Kaplan, Z.S.; Jackson, S.P. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Hematology* **2011**, 51–61, doi:10.1182/asheducation-2011.1.51.
2. Nesbitt, W.S.; Mangin, P.; Salem, H.H.; Jackson, S.P. The Impact of Blood Rheology on the Molecular and Cellular Events Underlying Arterial Thrombosis. *J Mol Med* **2006**, *84*, 989–995, doi:10.1007/s00109-006-0101-1.
3. Nesbitt, W.S.; Westein, E.; Tovar-Lopez, F.J.; Tolouei, E.; Mitchell, A.; Fu, J.; Carberry, J.; Fouras, A.; Jackson, S.P. A Shear Gradient–Dependent Platelet Aggregation Mechanism Drives Thrombus Formation. *Nat Med* **2009**, *15*, 665–673, doi:10.1038/nm.1955.
4. Receveur, N.; Nechipurenko, D.; Knapp, Y.; Yakusheva, A.; Maurer, E.; Denis, C.; Lanza, F.; Panteleev, M.; Gachet, C.; Mangin, P. Shear Rate Gradients Promote a Bi-Phasic Thrombus Formation on Weak Adhesive Proteins, Such as Fibrinogen in a VWF-Dependent Manner. *haematol* **2020**, *105*, 2471–2483, doi:10.3324/haematol.2019.235754.
5. Majithia, A.; Bhatt, D.L. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *ATVB* **2019**, *39*, 546–557, doi:10.1161/ATVBAHA.118.310955.
6. Weller, J.M.; Meissner, J.N.; Stösser, S.; Dorn, F.; Petzold, G.C.; Bode, F.J.; GSR-ET investigators; Reich, A.; Nikoubashman, O.; Röther, J.; et al. Mechanical Thrombectomy in Patients with Acute Ischemic Stroke and Concomitant Intracranial Hemorrhage. *Clin Neuroradiol* **2022**, doi:10.1007/s00062-021-01128-9.
7. Donkor, E.S. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Research and Treatment* **2018**, *2018*, 1–10, doi:10.1155/2018/3238165.
8. Pop, R.; Zinchenko, I.; Quenardelle, V.; Mihoc, D.; Manisor, M.; Richter, J.S.; Severac, F.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Rouyer, O.; et al. Predictors and Clinical Impact of Delayed Stent Thrombosis after Thrombectomy for Acute Stroke with Tandem Lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* **2019**, *ajnr*;ajnr.A5976v1, doi:10.3174/ajnr.A5976.
9. Allard, J.; Delvoye, F.; Pop, R.; Labreuche, J.; Maier, B.; Marnat, G.; Sibon, I.; Zhu, F.; Lapergue, B.; Consoli, A.; et al. 24-Hour Carotid Stent Patency and Outcomes After Endovascular Therapy: A Multicenter Study. *Stroke* **2023**, *54*, 124–131, doi:10.1161/STROKEAHA.122.039797.
10. Renú, A.; Blasco, J.; Laredo, C.; Llull, L.; Urra, X.; Obach, V.; López-Rueda, A.; Rudilosso, S.; Zarco, F.; González, E.; et al. Carotid Stent Occlusion after Emergent Stenting in Acute Ischemic Stroke: Incidence, Predictors and Clinical Relevance. *Atherosclerosis* **2020**, *313*, 8–13, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.002.
11. Pop, R.; Hasiu, A.; Mangin, P.H.; Severac, F.; Mihoc, D.; Nistoran, D.; Manisor, M.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Gheoca, R.; et al. Postprocedural Antiplatelet Treatment after Emergent Carotid Stenting in Tandem Lesions Stroke: Impact on Stent Patency beyond Day 1. *AJNR Am J Neuroradiol* **2021**, *42*, 921–925, doi:10.3174/ajnr.A6993.
12. Steglich-Arnholm, H.; Holtmannspötter, M.; Kondziella, D.; Wagner, A.; Stavngaard, T.; Cronqvist, M.E.; Hansen, K.; Højgaard, J.; Taudorf, S.; Krieger, D.W. Thrombectomy Assisted by Carotid Stenting in Acute Ischemic Stroke Management: Benefits and Harms. *J Neurol* **2015**, *262*, 2668–2675, doi:10.1007/s00415-015-7895-0.
13. Lockau, H.; Liebig, T.; Henning, T.; Neuschmelting, V.; Stetefeld, H.; Kabbasch, C.; Dorn, F. Mechanical Thrombectomy in Tandem Occlusion: Procedural Considerations and Clinical Results. *Neuroradiology* **2015**, *57*, 589–598, doi:10.1007/s00234-014-1465-5.
14. Kern, A.Y.; Kreinin, Y.; Charle, L.; Epshteyn, M.; Korin, N.; Mangin, P.H. A Macrofluidic Model to Investigate the Intrinsic Thrombogenicity of Clinically Used Stents and Develop Less Thrombogenic Stents. *Heliyon* **2024**, e26550, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26550.
15. Bharadvaj, B.K.; Mabon, R.F.; Giddens, D.P. Steady Flow in a Model of the Human Carotid Bifurcation. Part I—Flow Visualization. *Journal of Biomechanics* **1982**, *15*, 349–362, doi:10.1016/0021-9290(82)90057-4.
16. Kolachalama, V.B.; Bressloff, N.W.; Nair, P.B. Mining Data from Hemodynamic Simulations via Bayesian Emulation. *BioMed Eng OnLine* **2007**, *6*, doi:10.1186/1475-925X-6-47.

17. Krejza, J.; Arkuszewski, M.; Kasner, S.E.; Weigele, J.; Ustymowicz, A.; Hurst, R.W.; Cucchiara, B.L.; Messe, S.R. Carotid Artery Diameter in Men and Women and the Relation to Body and Neck Size. *Stroke* **2006**, *37*, 1103–1105, doi:10.1161/01.STR.0000206440.48756.f7.
18. Kpuduwei, S.P.K.; Kiridi, E.K.; Fawehinmi, H.B.; Oladipo, G.S. Reference Luminal Diameters of the Carotid Arteries among Healthy Nigerian Adults. *Folia Morphol (Warsz)* **2021**, doi:10.5603/FM.a2021.0062.
19. Khoury, M.; Epshtein, M.; Korin, N. In Vitro 3D Cell-Cultured Arterial Models for Studying Vascular Drug Targeting Under Flow. *J Vis Exp* **2021**, *14*, doi:10.3791/62279.
20. Khoury, M.; Epshtein, M.; Zidan, H.; Zukerman, H.; Korin, N. Mapping Deposition of Particles in Reconstructed Models of Human Arteries. *Journal of Controlled Release* **2020**, *318*, 78–85, doi:10.1016/j.jconrel.2019.12.004.
21. Ohlmann, P.; Eckly, A.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Offermanns, S.; Gachet, C. ADP Induces Partial Platelet Aggregation without Shape Change and Potentiates Collagen-Induced Aggregation in the Absence of Gαq. *Blood* **2000**, *96*, 2134–2139, doi:10.1182/blood.V96.6.2134.
22. Shanahan, C.; Tiernan, P.; Tofail, S.A.M. Looped Ends versus Open Ends Braided Stent: A Comparison of the Mechanical Behaviour Using Analytical and Numerical Methods. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2017**, *75*, 581–591, doi:10.1016/j.jmbbm.2017.08.025.
23. Johnston, B.M.; Johnston, P.R.; Corney, S.; Kilpatrick, D. Non-Newtonian Blood Flow in Human Right Coronary Arteries: Steady State Simulations. *Journal of Biomechanics* **2004**, *37*, 709–720, doi:10.1016/j.jbiomech.2003.09.016.
24. Martorell, J.; Santomá, P.; Kolandaivelu, K.; Kolachalama, V.B.; Melgar-Lesmes, P.; Molins, J.J.; Garcia, L.; Edelman, E.R.; Balcells, M. Extent of Flow Recirculation Governs Expression of Atherosclerotic and Thrombotic Biomarkers in Arterial Bifurcations. *Cardiovascular Research* **2014**, *103*, 37–46, doi:10.1093/cvr/cvu124.
25. Johari, N.H.; Hamady, M.; Xu, X.Y. A Computational Study of the Effect of Stent Design on Local Hemodynamic Factors at the Carotid Artery Bifurcation: *ARTRES* **2020**, *26*, 161, doi:10.2991/artres.k.200603.001.
26. Emonts, C.; Grigat, N.; Merkord, F.; Vollbrecht, B.; Idrissi, A.; Sackmann, J.; Gries, T. Innovation in 3D Braiding Technology and Its Applications. *Textiles* **2021**, *1*, 185–205, doi:10.3390/textiles1020009.
27. Tan, F.P.P.; Soloperto, G.; Bashford, S.; Wood, N.B.; Thom, S.; Hughes, A.; Xu, X.Y. Analysis of Flow Disturbance in a Stenosed Carotid Artery Bifurcation Using Two-Equation Transitional and Turbulence Models. *Journal of Biomechanical Engineering* **2008**, *130*, 061008, doi:10.1115/1.2978992.
28. Cisneros, J.A.; Newhouse, V.L.; Goldberg, B. Doppler Spectral Characterization of Flow Disturbances in the Carotid with the Doppler Probe at Right Angles to the Vessel Axis. *Ultrasound in Medicine & Biology* **1985**, *11*, 319–328, doi:10.1016/0301-5629(85)90131-0.
29. Jiang, Y.; Kohara, K.; Hiwada, K. Low Wall Shear Stress Contributes to Atherosclerosis of the Carotid Artery in Hypertensive Patients. *Hypertens Res* **1999**, *22*, 203–207, doi:10.1291/hyres.22.203.
30. Benetos, A.; Simon, A.; Levenson, J.; Lagneau, P.; Bouthier, J.; Safar, M. Pulsed Doppler: An Evaluation of Diameter, Blood Velocity and Blood Flow of the Common Carotid Artery in Patients with Isolated Unilateral Stenosis of the Internal Carotid Artery. *Stroke* **1985**, *16*, 969–972, doi:10.1161/01.STR.16.6.969.
31. Yang, S.; Woo, S.; Kim, D. Analysis of Atherosclerotic Plaque Distribution in the Carotid Artery. *Clinical Cardiology* **2022**, *45*, 1272–1276, doi:10.1002/clc.23903.
32. Han, Q.; Shea, S.M.; Arleo, T.; Qian, J.Y.; Ku, D.N. Thrombogenicity of Biomaterials Depends on Hemodynamic Shear Rate. *Artificial Organs* **2022**, *46*, 606–617, doi:10.1111/aor.14093.
33. Herbig, B.A.; Diamond, S.L. Pathological von Willebrand Factor Fibers Resist Tissue Plasminogen Activator and ADAMTS13 While Promoting the Contact Pathway and Shear-induced Platelet Activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2015**, *13*, 1699–1708, doi:10.1111/jth.13044.
34. Chandler, A.B. In Vitro Thrombotic Coagulation of the Blood; a Method for Producing a Thrombus. *Lab Invest* **1958**, *7*, 110–114.
35. Sakariassen, K.S.; Aarts, P.A.; de Groot, P.G.; Houdijk, W.P.; Sixma, J.J. A Perfusion Chamber Developed to Investigate Platelet Interaction in Flowing Blood with Human Vessel Wall Cells, Their Extracellular Matrix, and Purified Components. *Lab J Clin Med* **1983**, *102*, 522–535.

36. Engels, G.E.; Blok, S.L.J.; van Oeveren, W. *In Vitro* Blood Flow Model with Physiological Wall Shear Stress for Hemocompatibility Testing—An Example of Coronary Stent Testing. *Biointerphases* **2016**, *11*, 031004, doi:10.1116/1.4958979.
37. Jackson, S.P.; Nesbitt, W.S.; Westein, E. Dynamics of Platelet Thrombus Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 17–20, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x.
38. Hara, H.; Nakamura, M.; Palmaz, J.C.; Schwartz, R.S. Role of Stent Design and Coatings on Restenosis and Thrombosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 377–386, doi:10.1016/j.addr.2006.01.022.
39. Nazneen, F.; Herzog, G.; Arrigan, D.W.M.; Caplice, N.; Benvenuto, P.; Galvin, P.; Thompson, M. Surface Chemical and Physical Modification in Stent Technology for the Treatment of Coronary Artery Disease. *J. Biomed. Mater. Res.* **2012**, *100B*, 1989–2014, doi:10.1002/jbm.b.32772.
40. Scafa Udriște, A.; Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A.M.; Bădilă, E. Cardiovascular Stents: A Review of Past, Current, and Emerging Devices. *Materials* **2021**, *14*, 2498, doi:10.3390/ma14102498.
41. Jaffer, I.H.; Fredenburgh, J.C.; Hirsh, J.; Weitz, J.I. Medical Device-Induced Thrombosis: What Causes It and How Can We Prevent It? *J Thromb Haemost* **2015**, *13*, S72–S81, doi:10.1111/jth.12961.
42. Zafar, M.U.; Bravo-Cordero, J.J.; Torramade-Moix, S.; Escolar, G.; Jerez-Dolz, D.; Lev, E.I.; Badimon, J.J. Effects of Electret Coating Technology on Coronary Stent Thrombogenicity. *Platelets* **2022**, *33*, 312–319, doi:10.1080/09537104.2021.1912313.
43. Kolandaivelu, K.; Swaminathan, R.; Gibson, W.J.; Kolachalama, V.B.; Nguyen-Ehrenreich, K.-L.; Giddings, V.L.; Coleman, L.; Wong, G.K.; Edelman, E.R. Stent Thrombogenicity Early in High-Risk Interventional Settings Is Driven by Stent Design and Deployment and Protected by Polymer-Drug Coatings. *Circulation* **2011**, *123*, 1400–1409, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.003210.
44. Pfaff, J.A.R.; Maurer, C.; Broussalis, E.; Janssen, H.; Blanc, R.; Dargazanli, C.; Costalat, V.; Piotin, M.; Runck, F.; Berlis, A.; et al. Acute Thromboses and Occlusions of Dual Layer Carotid Stents in Endovascular Treatment of Tandem Occlusions. *J NeuroIntervent Surg* **2020**, *12*, 33–37, doi:10.1136/neurintsurg-2019-015032.
45. Coelho, A.P.; Lobo, M.; Nogueira, C.; Gouveia, R.; Campos, J.; Augusto, R.; Coelho, N.; Semião, A.C.; Canedo, A. Overview of Evidence on Risk Factors and Early Management of Acute Carotid Stent Thrombosis during the Last Two Decades. *Journal of Vascular Surgery* **2019**, *69*, 952–964, doi:10.1016/j.jvs.2018.09.053.
46. Yilmaz, U.; Körner, H.; Mühl-Benninghaus, R.; Simgen, A.; Kraus, C.; Walter, S.; Behnke, S.; Faßbender, K.; Reith, W.; Unger, M.M. Acute Occlusions of Dual-Layer Carotid Stents After Endovascular Emergency Treatment of Tandem Lesions. *Stroke* **2017**, *48*, 2171–2175, doi:10.1161/STROKEAHA.116.015965.
47. Klail, T.; Kurmann, C.; Kaesmacher, J.; Mujanovic, A.; Piechowiak, E.I.; Dobrocky, T.; Pilgram-Pastor, S.; Scutelnic, A.; Heldner, M.R.; Gralla, J.; et al. Safety and Efficacy of Carotid Artery Stenting with the CGuard Double-Layer Stent in Acute Ischemic Stroke. *Clin Neuroradiol* **2023**, *33*, 237–244, doi:10.1007/s00062-022-01209-3.
48. Pop, R.; Severac, F.; Hasiu, A.; Mihoc, D.; Mangin, P.H.; Chibbaro, S.; Simu, M.; Tudor, R.; Gheoca, R.; Quenardelle, V.; et al. Conservative versus Aggressive Antiplatelet Strategy for Emergent Carotid Stenting during Stroke Thrombectomy. *Interv Neuroradiol* **2022**, 159101992210831, doi:10.1177/15910199221083112.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of the macrofluidic flow system. (A) 3D-printed scaffold to cast the model of the human carotid artery. The diameter of the inlet in the common carotid is 6 mm and the outlets have diameters of 4.3 and 3.6 mm in the internal and external carotid, respectively. The largest diameter of the model is at the carotid bulb (6.6 mm). (B) Final elastosil flow chamber mimicking the three-way carotid artery: the common carotid artery (CCA), external carotid artery (ECA) and internal carotid artery (ICA). (C) Computational fluid dynamics (CFD) simulations to characterize the bloodstream, flow stream and wall shear rate (WSR) inside the carotid artery chamber. (D) Representation of the closed circuit through which hirudinized human whole blood is perfused, including the chamber, a peristaltic pump, a water bath at 37°C and a fluorescence microscope. (E, F) Platelet-rich plasma (PRP) was stimulated with collagen (2.5 µg/mL). (E) Platelet aggregation after 0 (green line) and 45 min (red line) of perfusion. Representative curves from four different experiments on four different days. (F) Mean maximum platelet aggregation after 0, 5, 15, 30 and 45 min of perfusion (n = 4). Values are the mean ± the standard error of the mean. (G, H) Whole blood incubated with DiOC₆ was perfused for one hour through a chamber in which the internal carotid region had been coated with collagen. (G) Platelet aggregates (green) are seen in the collagen-coated zone (dotted red lines). Scale bars: 4 mm. (H) Quantification of the platelet accumulation in the coated zone of the internal carotid chamber (***) p = 0.0001 (n = 3). Values are the mean ± the standard error of the mean. (I) Scanning electron microscopy (SEM) images of the lumen of a chamber coated with collagen after one hour of blood perfusion. Scale bars: 50 µm (left) and 15 µm (right).

Supplemental Figure 1: Characterization of platelet functions after perfusion of blood through the carotid artery chamber. Platelet-rich plasma (PRP) was stimulated with adenosine-5'-diphosphate (ADP) (5 $\mu\text{mol/L}$). **(A)** Platelet aggregation after 0 (green line) and 45 min (red line) of perfusion. Representative curves from four different experiments on four different days. **(B)** Mean maximum platelet aggregation after 0, 5, 15, 30 and 45 min of perfusion (n = 4). Values are the mean \pm the standard error of the mean.

Figure 2: Blood flows in the carotid bifurcation generate a thrombus in a stent. **(A)** Zone where a stent is inserted inside the carotid chamber. The black arrows point to the two extremities of the stent in the internal and common carotid arteries. **(B)** Commercial Casper stent (left) and Wallstent (right). Scale bar: 4 mm. **(C)** Carotid bifurcation area with or without a stent after one hour of perfusion of hirudinized human whole blood labeled with DiOC₆. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. **(D)** Quantification of the platelet accumulation in the bifurcation region (** p = 0.0005) (n = 6). Values are the mean \pm the standard error of the mean. **(E)** SEM images showing a massive aggregate in the Casper stent (left) and Wallstent (right), both rich in highly activated platelets. The white arrows indicate filopodia. Scale bars: 250 μm (upper left), 150 μm (upper right) and 5 μm (bottom).

Figure 3: The carotid bifurcation is a primary site of thrombus formation in stents. **(A)** Numbers of patients with documented stent thrombosis (ST) (31) or not (116). **(B)** Angiography scans showing ST (white arrows) in the internal carotid (left) and the carotid bifurcation (middle). **(C)** Numbers of patients with documented ST experiencing ST at the bifurcation (12) or not (19).

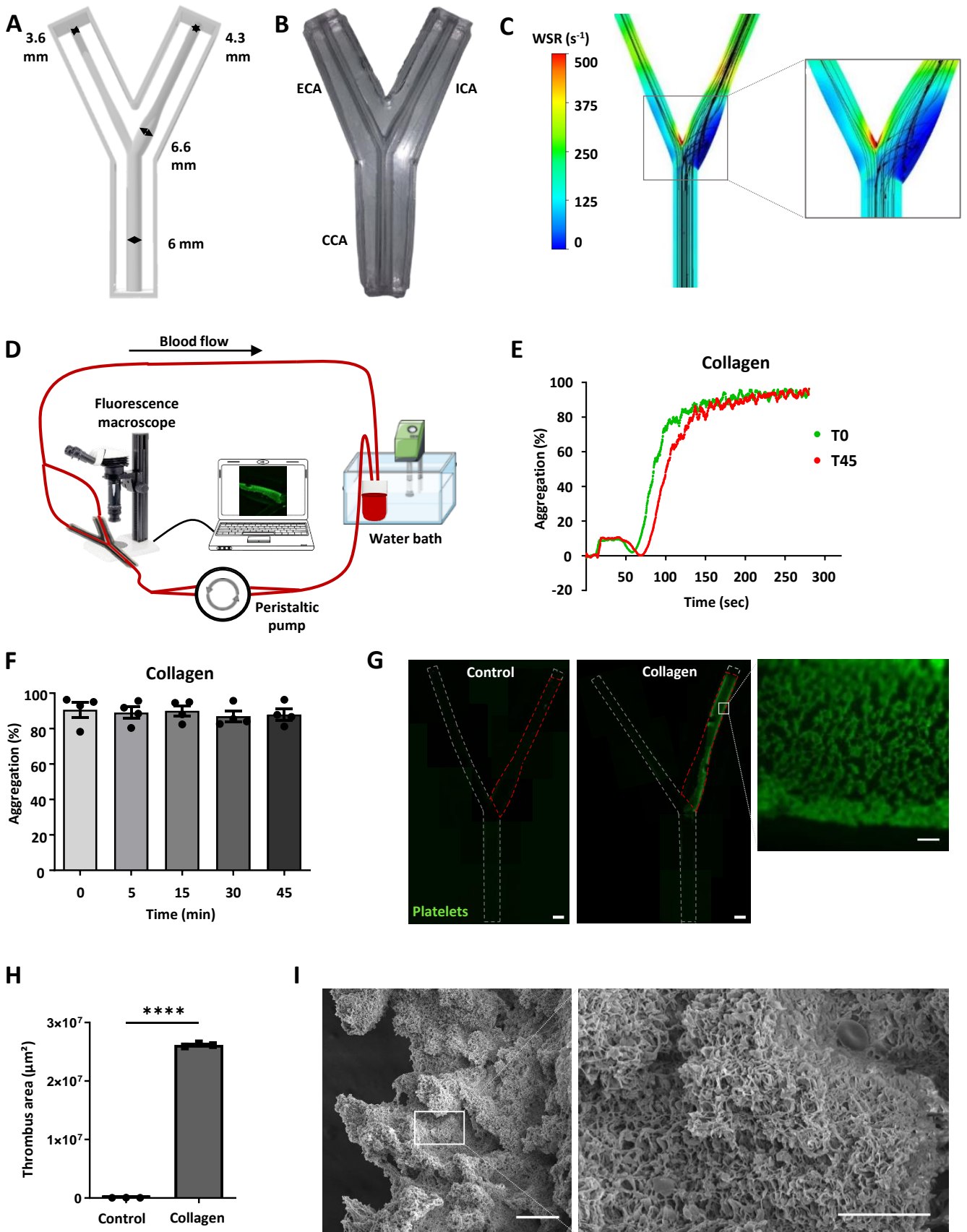
Figure 4: Simulation of the thrombogenic flows generated by stents in the carotid bifurcation. (A) Top views of the physical model (left) and a cut-out of the geometry used for CFD analysis showing the vessel and the stent element at the bifurcation (right). (B) Simulation of flow through the Casper stent showing high flow rates in the stent resulting in pathologically high wall shear rates at the struts ($> 5,000 \text{ s}^{-1}$). While the high shear region is spread over the external carotid entrance zone of the stent, the highest shear rates are biased towards the bifurcation. (C) Simulation of flow through the Wallstent showing high flow rates in the stent resulting in pathologically high wall shear rates at the struts ($> 5,000 \text{ s}^{-1}$). The high shear region is spread over the external carotid entrance zone of the stent with some bias towards the bifurcation but less than in the Casper stent.

Figure 5: Pharmacological inhibition of platelet accumulation in two clinically used stents placed in the carotid bifurcation. Hirudinated human whole blood labeled with DiOC₆ was perfused for one hour through the flow system containing a Casper stent or a Wallstent, in the presence or absence of aspirin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A-B) or abciximab, an $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ inhibitor (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C-D). Platelets appear in green. Scale bars: 2 mm. Quantitative values are the mean \pm the standard error of the mean. (A) Pictures of the lumen of a Casper stent placed in the bifurcation after perfusion of blood with (right) and without (left) aspirin. Quantification of the platelet accumulation in a Casper stent (** $p = 0.0036$) ($n = 8$). (B) Pictures of the lumen of a Wallstent placed in the bifurcation after perfusion of blood with (right) and without (left) aspirin. Quantification of the platelet accumulation in a Wallstent ($p < 0.05$) ($n = 7$). (C) Pictures of the lumen of a Casper stent placed in the bifurcation after perfusion of blood with (right) and without (left) abciximab. Quantification of the platelet accumulation in a Casper stent (** $p = 0.0018$) ($n = 5$). (D) Pictures of the lumen of a Wallstent placed in the bifurcation after

perfusion of blood with (right) and without (left) abciximab. Quantification of the platelet accumulation in a Wallstent (* p = 0.0111) (n= 7).

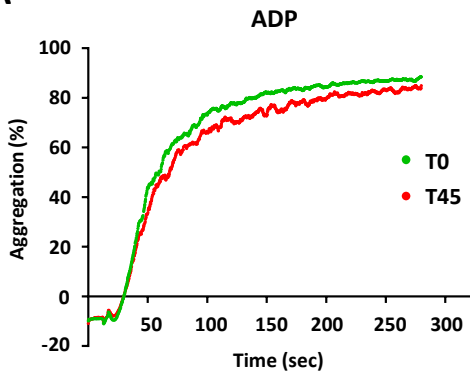
Figure 6: An opening at the carotid bifurcation prevents the formation of a large thrombus in a stent. (A) New 8 x 40 mm stents were designed, one with a 10 mm diameter hole in its center (open stent, right) and the other without a hole (control full stent, left). Scale bar: 4 mm. (B) Picture of the lumen of a control stent placed in the carotid bifurcation after perfusion of blood labeled with DiOC₆. Platelets appear in green. Scale bar: 2 mm. (C) Numbers of control stents (4/7), Casper stents (6/6) and Wallstents (4/6) presenting a thrombus (platelet aggregates covering more than $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) at the bifurcation after one hour of blood perfusion. (D) Picture of the lumen of an open stent placed in the carotid bifurcation after perfusion of blood labeled with DiOC₆. Platelets appear in green. Scale bar: 2 mm. (E) Quantification of the platelet accumulation in the bifurcation region (* p = 0.0286) (n = 4). Values are the mean \pm the standard error of the mean.

Figure 1



Supplementary Figure 1

A



B

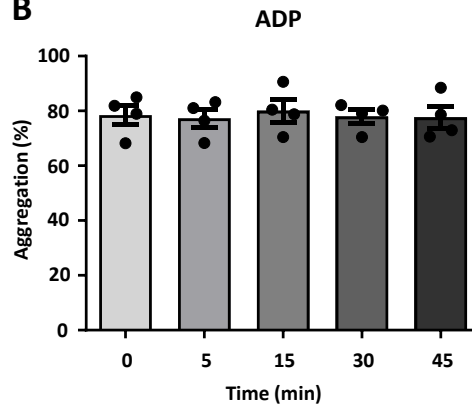


Figure 2

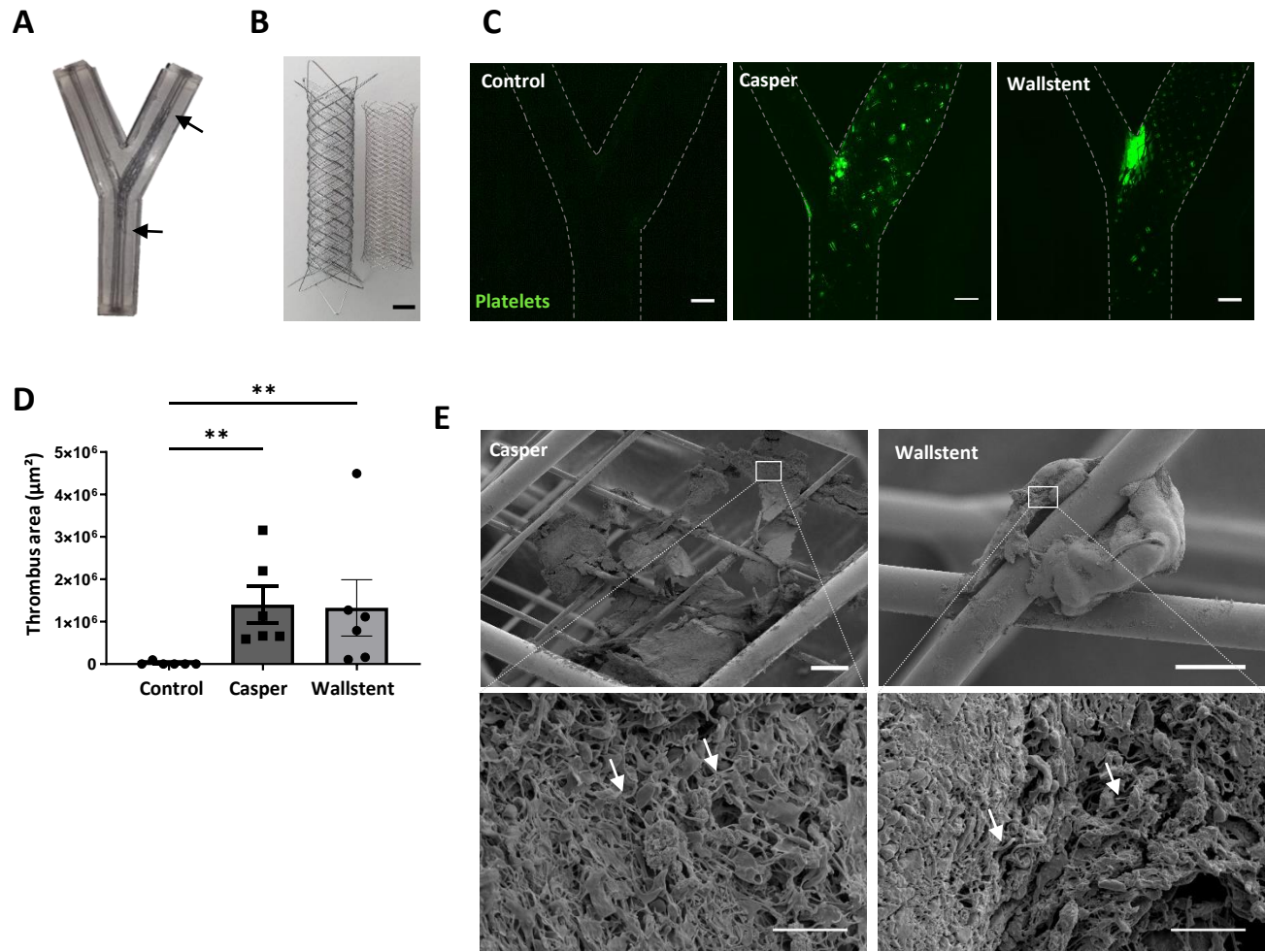
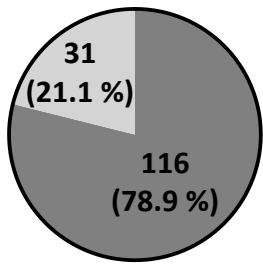


Figure 3

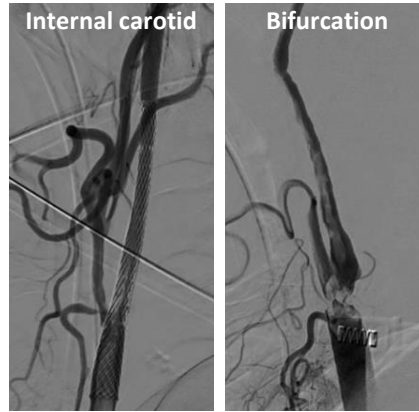
A



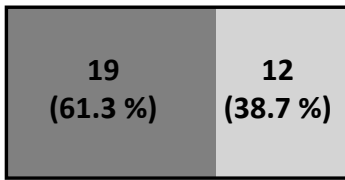
Total : 147

■ No ST
□ ST

B



C

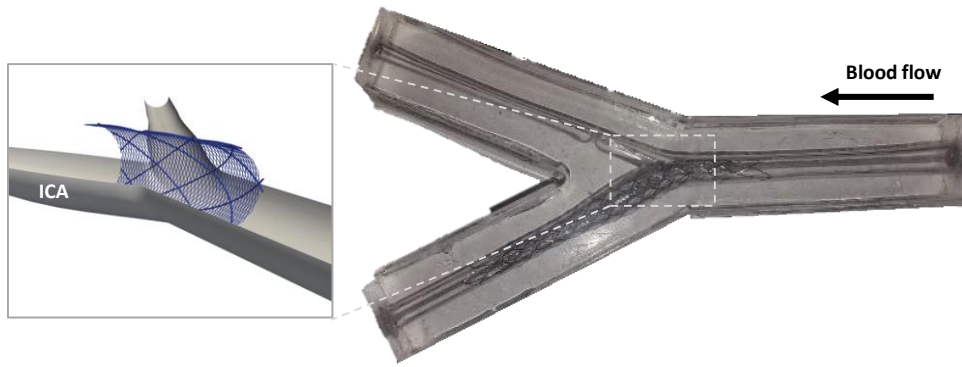


Total : 31

■ No thrombus at the bifurcation
□ Thrombus at the bifurcation

Figure 4

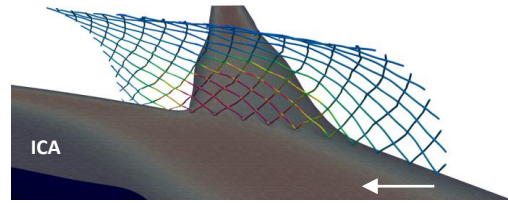
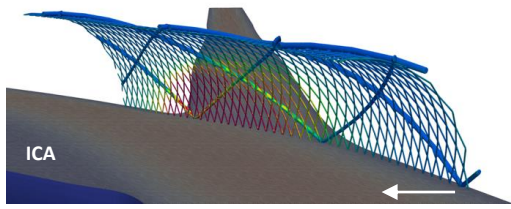
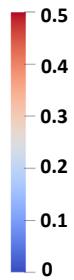
A



B Casper Stent

C Wallstent

Velocity (m/s)



WSR (s^{-1})

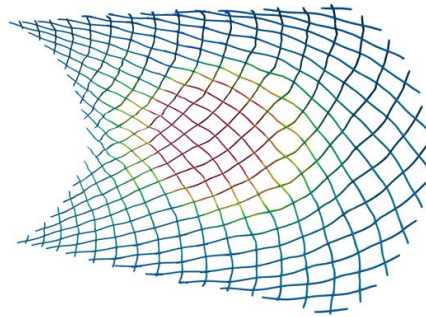
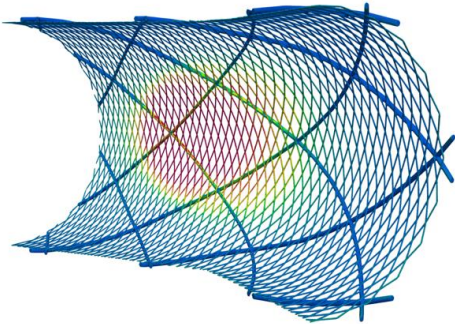
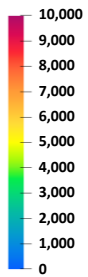


Figure 5

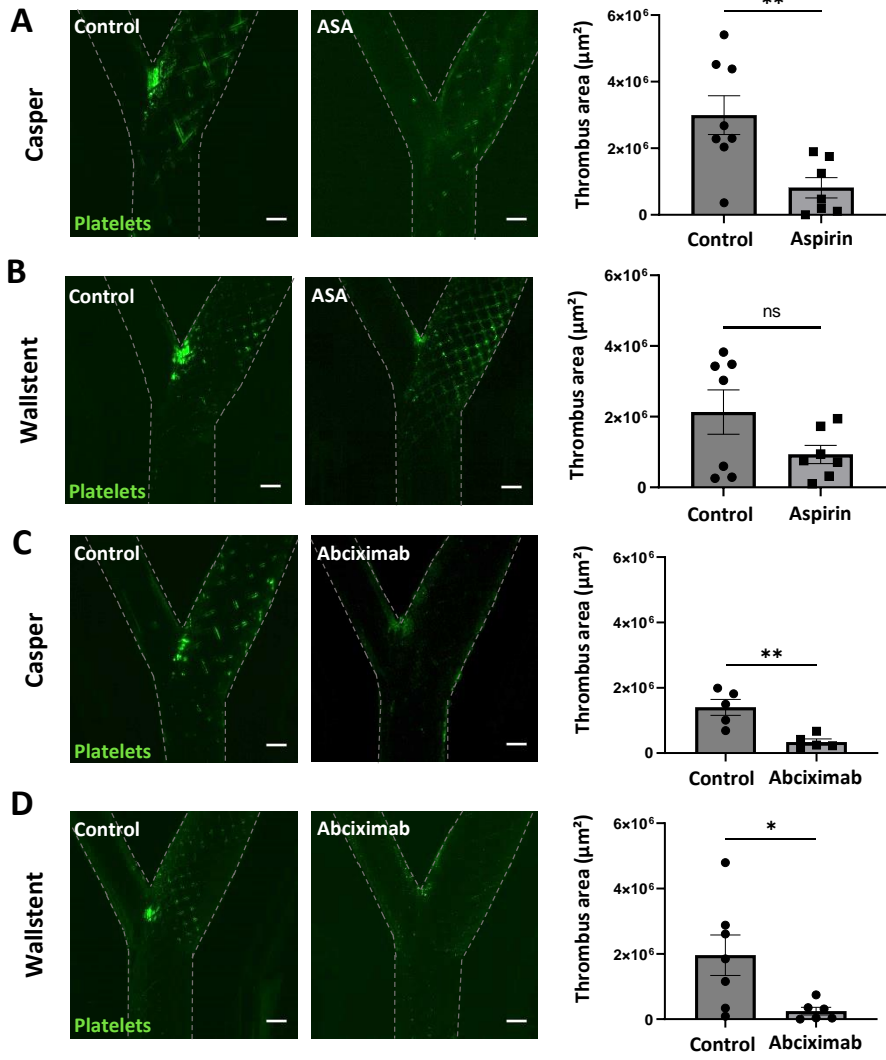
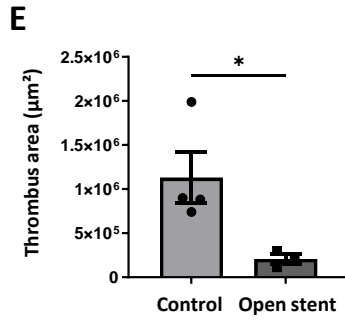
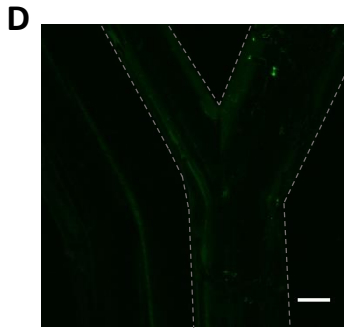
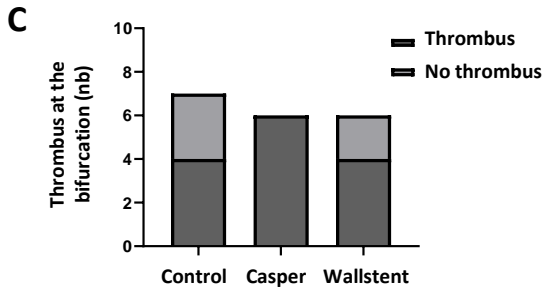
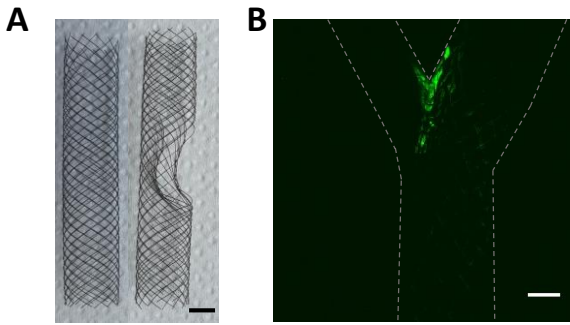


Figure 6



Conclusion

Ce manuscrit décrit et caractérise le premier modèle macrofluidique imitant étroitement la géométrie de l'artère carotide humaine. Ce dispositif est adapté à l'étude de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. Nous avons démontré que deux stents largement utilisés en clinique, à savoir le stent Casper et le Wallstent, sont thrombogènes lorsqu'ils sont évalués dans le modèle macrofluidique, car on observe la présence de thrombi sur les mailles. Une observation majeure de mon travail est que les deux stents déclenchent la formation d'un thrombus massif dans la bifurcation carotidienne, là où les mailles du stent sont dans la lumière du vaisseau. Ces observations par microscopie photonique et électronique ont été corrélées avec des observations cliniques chez des patients victimes d'une thrombose de stent carotidien. La dynamique des fluides assistée par ordinateur (CFD : *computational fluid dynamic*) a indiqué qu'un stent placé dans la lumière de la bifurcation carotidienne modifie le flux sanguin local, générant un environnement prothrombotique avec des taux de cisaillements très élevés. La formation de ce thrombus s'est avérée sensible à l'aspirine et aux antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$.

En résumé, mes résultats soulignent qu'en plus du matériau, le design du stent et son impact sur la rhéologie jouent un rôle majeur dans la thrombogénicité du stent. Notre manuscrit indique que le modèle macrofluidique est particulièrement bien adapté à l'évaluation de la thrombogénicité des stents cliniques actuels et nouvellement développés, et pourrait contribuer au développement de stents moins thrombogènes.

Le design des stents joue un rôle dans leur thrombogénicité

Publication 4 :

**« Stent thrombogenicity, design matters:
the wire crossings of braided stents are highly thrombogenic »**

Axelle Y. Kern¹, Lise Charle¹, Yevgeniy Kreinin², Mark Ephstein², Christian J. Spieker³, Nabil Chakfé^{4,5}, Gábor Závodszky³, Raoul Pop^{1,6}, Netanel Korin², Pierre H. Mangin¹

¹University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France; ²Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel; ³Computational Science Lab, Informatics Institute, Faculty of Science, University of Amsterdam, The Netherlands; ⁴Vascular Surgery and Renal Transplantation Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France; ⁵GEPROMED, Strasbourg, France; ⁶Interventional Neuroradiology Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

En préparation pour être soumis à PNAS.

Introduction

Environ 20 % des patients victimes d'un AVC ischémique présentent une sténose carotidienne, également appelée lésion en tandem, qui nécessite l'implantation d'un stent lors du traitement de l'AVC pour limiter le risque d'une nouvelle embolisation et de récurrence de l'AVC. L'une des principales complications de l'implantation d'un stent est la thrombose de stent, qui est particulièrement préjudiciable pour les patients. L'amélioration de l'approche pharmacologique dans ce contexte étant très limitée en raison du risque important de transformation hémorragique de l'AVC, la réduction de l'incidence de la thrombose de stent pourrait passer par une réduction de la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique. En effet, les stents sont connus pour être thrombogènes par eux-mêmes, et l'un des principaux déterminants est leur design. Une compréhension approfondie des mécanismes sous-jacents à la thrombogénicité intrinsèque des stents est donc essentielle pour envisager le développement de stents moins thrombogènes et réduire ainsi l'incidence de la thrombose de stent.

L'objectif de mon quatrième manuscrit de thèse est d'évaluer le rôle du design des mailles de stents dans leur thrombogénicité intrinsèque. Cette étude est basée sur l'utilisation du dispositif macrofluidique nouvellement développé dans lequel le sang total est perfusé à un débit physiologique humain à travers une chambre carotidienne. Nous avons étudié trois stents carotidiens présentant des caractéristiques différentes : le Casper, un stent tressé à double couche, le Wallstent, un stent tressé à simple couche, et le Protégé RX, un stent coupé au laser. J'ai tout d'abord caractérisé par microscopie à épifluorescence et microscopie électronique à balayage la formation de thrombi sur ces trois stents. Je me suis également intéressée aux mécanismes par lesquels les plaquettes adhèrent et agrègent au stent en utilisant différents agents pharmacologiques. Enfin, des analyses *in silico* et de dynamique des fluides assistée par ordinateur (CFD : *computational fluid dynamic*) ont permis de caractériser plus finement les flux responsables de la thrombose à l'échelle cellulaire.

Ce travail, pour lequel je signe premier auteur, sera soumis prochainement à PNAS.

Stent thrombogenicity depends on design: the wire crossings of braided stents are highly thrombogenic

Axelle Y. Kern¹, Lise Charle¹, Yevgeniy Kreinin², Mark Epshtein², Christian J. Spieker³, Nabil Chakfé^{4,5}, Gábor Závodszky³, Raoul Pop^{1,6}, Netanel Korin², Pierre H. Mangin¹

¹University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMST, F-67065 Strasbourg, France; ²Department of Biomedical Engineering Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel; ³Computational Science Lab, Informatics Institute, Faculty of Science, University of Amsterdam, The Netherlands; ⁴Vascular Surgery and Renal Transplantation Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France; ⁵GEPROMED, Strasbourg, France; ⁶Interventional Neuroradiology Department, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

Short title: Wire crossings of braided stents generate thrombogenic low shear pockets

Text word count: 4000

Abstract word count: 214

Number of figures: 5

Number of table: 1

Number of references: 32

Correspondence to: Pierre Mangin at UMR_S1255, EFS-Grand Est, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg Cedex, France; Tel: (33) 388 21 25 25; Fax: (33) 388 21 25 21, E-mail: pierre.mangin@efs.sante.fr

Key Points:

- Clinically used carotid stents are thrombogenic *per se*.
- The wire crossings of braided stents are hot spots of thrombosis.
- Wire crossings profoundly modify the local blood flow and cell distribution.
- Wire crossings should be limited to avoid a high risk of stent thrombosis.

ABSTRACT

Stent thrombosis remains a deadly complication of angioplasty with stenting. Although antiplatelet therapy markedly reduces its incidence, stent thrombosis remains particularly frequent in patients with tandem lesions, reaching 20 %. Our laboratory has developed a macrofluidic model mimicking the geometry of the human carotid artery, which is perfectly suited to study the intrinsic thrombogenicity of carotid stents. Real-time video microscopy and scanning electron microscopy were used to evaluate the thrombogenicity of three clinically used carotid stents, the laser-cut Protégé RX and the braided Wallstent and Casper stent. The Casper stent and the Wallstent led to much more platelet adhesion and thrombus formation than the Protégé RX stent. The thrombi were essentially localized at the intersections of the metal wires in the braided stents, but not in the laser-cut stent. Hot spots of thrombosis were identified at the crossings of the stent struts and particularly around the proximal wires of these crossings in contact with the vessel wall. Immunofluorescence showed that fibrinogen adsorbed onto the wires, triggering thrombosis, which was prevented in the presence of aspirin or the $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ blocker abciximab. Computational fluid dynamics indicated that the wire crossings of braided stents generate a prothrombotic shear environment, with notably flow recirculation and stagnation leading to thrombus formation, as evidenced by a macroscale *in silico* simulation.

Key words: macrofluidic, stent, wire crossing, thrombosis

INTRODUCTION

Ischemic stroke is a life-threatening pathology resulting from a thrombus occluding a cerebral artery [1–3]. Around 20% of ischemic stroke patients present ongoing carotid stenosis, also called a tandem lesion, which requires implantation of a stent during thrombectomy to limit the risk of new embolization and thus stroke recurrence [4,5]. One major complication of stent implantation is acute stent thrombosis (ST), which is an independent predictor of a poor neurological outcome and particularly harmful for the patients [5–9]. As it is difficult to improve the pharmacological approach in this setting due to the lack of antithrombotic agents devoid of a bleeding risk, strategies to decrease the incidence of ST should focus rather on reducing the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents.

Stents are known to be thrombogenic in themselves, one of the main determinants being their material [10,11]. It has been shown that the materials used to fabricate stents, including stainless steel, tantalum and titanium or cobalt alloys, cause platelet adhesion and activation and hence result in thrombosis. Indeed, artificial surfaces can adsorb plasma proteins, primarily fibrinogen, which in turn recruit circulating blood cells, mainly platelets [12–15]. Moreover, the stent surface activates the contact pathway of coagulation, leading to the generation of thrombin, which enhances thrombus growth while also transforming fibrinogen into insoluble fibrin, thereby stabilizing the clot formed and preventing the blood flow from removing adherent platelets [12,15]. Another determinant of the thrombogenicity of stents is their design, as evidenced by the fact that dual-layered stents present a higher rate of ST than single-layered stents, although the underlying mechanism remains poorly defined [16–18]. In addition, it has been shown that material-induced thrombosis is dependent on

both the local rheology and the material surface, as platelet adherence on a biomaterial is influenced by pre-adsorbed proteins and blood flow [15,19].

It is well known that the blood flow plays an important role in triggering arterial thrombosis [2,20]. In a stenosed vessel, notably due to the presence of an evolved atherosclerotic plaque promoting stenosis, the laminar blood flow is altered with a rapid acceleration and elongational flow in the pre-stenotic region, followed by extremely high shear rates in the stenosis throat, both of which facilitate vWF unfolding and thereby favor platelet aggregation. In the post-stenotic zone, the reduction in velocity leads to flow disruption with areas of recirculation, stasis and reverse flow, all highly thrombogenic. For instance, these rheological disturbances make endothelial cells express more tissue factor, facilitating thrombin generation and platelet recruitment at the site of thrombosis. Moreover, the pockets of low flow and regions of recirculation maintain the platelets much longer in this area, enhancing their potential to adhere and aggregate [2,3,21,22]. Implanting a stent in a stenosed vessel aims at reopening the artery. However, the presence of the stent struts modifies the local rheological environment [23]. A numerical approach has already shown that implantation of a stent leads to disturbance of the flow in the vicinity of the stent and forms stagnation zones, which might facilitate platelet adhesion and activation. This nevertheless remains to be confirmed experimentally and the mechanisms are still elusive [23–25]. A thorough understanding of the mechanisms underlying stent thrombogenicity will be crucial to enable the development of less thrombogenic stents and reduce the incidence of ST in patients.

This study was based on the use of a newly developed macrofluidic device in which whole blood is perfused at relevant flow rates through stents implanted in a flow chamber reproducing the exact dimensions of the human carotid artery. Three different commercial

carotid stents were tested: the Casper stent, Wallstent and Protégé RX stent. Visualization of thrombus formation in the stents using epifluorescence and scanning electron microscopy (SEM) allowed us to identify their wire crossings as hot spots of thrombosis. Computational fluid dynamics (CFD) simulations enabled characterization of the regions of low flow favoring platelet adhesion and aggregation.

MATERIALS AND METHODS

Blood donation

In order to be eligible for the trial, donors had to be volunteer healthy adults between 18 and 70 years old. They were unpaid for the trial and donation. They were recruited and screened according to institutional guidelines from the French Blood Institute (Etablissement Français du Sang) and the in-force french regulations relative to blood donors' selection. They had to be free of anti-platelet drugs intake, for at least 10 days for aspirin and 3 days for non-steroid anti-inflammatory drugs. They were orally and writtenly informed of the partial or total use of their blood donation for research purposes, and signed an informed consent form before starting the trial.

Blood (45 mL) was collected into a Falcon tube containing hirudin (5 mL, final concentration: 100 U/mL) and kept at 37°C. The first few milliliters of blood were discarded to avoid platelet activation.

Macrofluidic flow chamber mimicking the carotid artery

The carotid flow chamber reproduced the average dimensions of the lumen of the human carotid artery (common, internal and external carotids). The fabrication of the chamber has been described previously [26].

Flow experiments

The chamber was passivated with 1% HSA (3 mL, Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 30 min at room temperature and then rinsed with PBS containing CaCl₂ (2 mmol/L, Sigma-Aldrich, Lyon, France) and MgCl₂ (1 mmol/L, Sigma-Aldrich, Lyon, France). A catheter was used to place a self-expanding commercial stent (Casper stent, Microvention France, Saint-Germain-en-Laye, France; Wallstent, Boston Scientific SAS, Voisins-le-Bretonneux, France; Protégé RX stent, Medtronic France SAS, Paris, France) in the chamber, at a similar position as in patients presenting ongoing thrombosis, *i.e.* extending from the common carotid through the carotid bulb to the internal carotid. The flow system composed of tubing, connectors, a peristaltic pump (Watson-Marlow, La Queue-lez-Yvelines, France), the chamber and a water bath was assembled as described previously [26]. The system was primed with 1X PBS at a flow rate of 380 mL/min (average flow rate in the human carotid [27]) to remove air bubbles and check for the absence of leaks. Human whole blood collected into hirudin (100 U/mL) and incubated with DiOC₆ (1 μmol/L, Molecular Probes, Paisley, UK) to label platelets was then perfused through the circuit for one hour at the same flow rate. When required, the blood was pre-incubated with the indicated concentration of aspirin or abciximab (both kindly supplied by the University Hospital of Strasbourg). Platelet adhesion and thrombus formation were visualized in real time under a fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

Scanning electron microscopy (SEM)

Stents were fixed for one hour with 2.5 % glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3, 305 mOsm) containing 2% sucrose. They were then washed two times with distilled water and the adherent platelets

were dehydrated in graded ethanol solutions. After replacement of ethanol by hexamethyl-1,1,1,3,3,3-disilazane (HMDS, Sigma-Aldrich, Lyon, France), the samples were air-dried, sputtered with platinum and examined under a Hitachi scanning electron microscope (Tokyo, Japan) [28].

Platelet-poor plasma preparation and plasma protein staining

After collection, blood is let for 10 to 30 minutes at 37°C, and centrifugated for 16 min at 250 g to recover platelet rich plasma (PRP). PRP is then centrifugated at 2200 g for the appropriate time, variable according to volume. Platelet free plasma (PPP) flow is done as described aforesaid. After one-hour perfusion, the stent is recovered, cut in as three parts, fixed in PFA (4 %) and blocked and permeabilised in a solution of PBS – BSA 2 % - Triton 0,1 %, both for half an hour at room temperature. The samples were then marked respectively with isotopically control (1/200) (GTX03260, Genetex, Euromedex, Souffelweyersheim, France), fibrinogen antibody (1/20) (AB7144F, Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France) or vWF antibody (1/50) (ab195028, Abcam, Cambridge, UK) for one hour. Antibodies were diluted in PBS – BSA 1 %. Samples were washed three times 5 min with PBS – Triton 0.1 % and one 5 min in distilled water. Samples were cut in half and observed with a DMI8 microscope (Leica, Nanterre, France).

Computational fluid dynamics

Computational fluid dynamic (CFD) simulations were performed as detailed previously (Kern *et al*, Advanced Science, submitted).

Multiscale simulation setup

To investigate the microscale flow environment, multiscale simulations were employed. Using one-way coupling, the continuum-scale CFD simulations were supplemented with cellular resolution computations in the vicinity of the wall, around the intersection of the stent struts. The flow and interaction of red blood cells and platelets in these regions for all three stents were computed with an established cellular simulation code [29]. The simulations reproduced a single repeating segment from each design to show qualitative trends relevant to thrombotic properties (*i.e.* stagnation zones, accumulation of platelets). The geometries of the stents have been scaled down 1:4 to save computational time. Blood was set to 30 % haematocrit and initialized with a fully mixed (homogeneous) cell distribution. The computational domain was periodic, mimicking the repeating stent segments along the flow direction. Local flow interactions, including platelet margination and cellular interactions with the stents, strongly influence the cell distributions and the appearing flow conditions. The simulations were evaluated after 1 s where the overall flow and cell profiles are stabilised.

Statistics

Results are expressed as the mean \pm the standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). Statistical significance between two groups was evaluated with Student's t-test or the Mann-Whitney test, according to whether the data followed respectively a Gaussian law or not. Statistical significance between several different groups was assessed with the Kruskal-Wallis test. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Outlier in Figure 1E was determined using Grubb's test.

RESULTS

The new macrofluidic device highlights distinct thrombogenicities of clinically-used stents.

To study the intrinsic thrombogenicity of clinically-used stents, we developed a closed loop macrofluidic system incorporating a flow chamber faithfully mimicking the human carotid artery and allowing us to perfuse hirudinized human whole blood through an implanted commercial stent (**Figure 1A, B**) [26]. We investigated the thrombogenicity of three clinically used stents: i) the Casper stent, a braided dual-layered stent made of nitinol, ii) the Wallstent, a braided single-layered stent made of CoCr and iii) the Protégé RX stent, a laser-cut stent made of nitinol (**Table 1, Figure 1C**). Video-microscopy images after perfusion of whole blood containing platelets labeled with DiOC₆ through stented chambers showed that the Casper stent presents more fluorescent signal than the Wallstent, while the Protégé RX showed barely any signal (**Figure 1D**). The fluorescent signal on the stent is specific as it is limited to the stented area of the chamber as it outlined the stent scaffold. In addition, a non-stented carotid chamber generated no signal, indicating that the implanted stent was responsible for the thrombogenicity (**Figure 1D**). These observations were confirmed by a quantification showing that the Casper stent was 3-times more thrombogenic compared to the Wallstent and 10-times more thrombogenic than the Protégé RX (Casper: $33.2 \pm 4.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Wallstent: $11.1 \pm 1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Protégé RX: $3.7 \pm 0.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0001$) (**Figure 1E**). Scanning electron microscopy images confirmed the occurrence of platelet adhesion and aggregation on the stent wires of both the Casper stent and the Wallstent, while only single platelets were attaching to the Protégé RX (**Figure 1F**). The thrombi were composed of tightly packed and highly activated platelets, as evidenced by their shape change and filopodia extension. These results indicated an important variability in the thrombogenicity of commercial stents which appears to rely on the stent design, while being largely independent

of the material, since the Casper stent and the Protégé RX are both made of nitinol, but present very distinctive thrombogenicities.

Stent meshes induce a perturbation in the flow velocity and local platelet concentration responsible for the thrombogenic potential of stents. To determine the variability in thrombogenicities of clinically-used carotid stents, an *in silico* multiscale simulation resolving cell trajectories in a stent artery segment was used. The velocity profiles in the Casper stent, Wallstent and Protégé RX stent and the average platelet concentrations around their wire crossings were estimated. The flow velocity was higher throughout the channel in the Protégé RX stent than in the Wallstent, where it was higher than in the Casper stent (**Figure 2A**). This more elevated velocity might limit adsorption of fibrinogen and adhesion of platelets, and therefore explain why Casper stent are more thrombogenic than Wallstents, and the latter more thrombogenic than Protégé RX stents. In addition, the inner layer of the Casper stent increased the recirculation which could already be observed in the Wallstent, while no recirculation was found in the Protégé RX simulation, which is another explanation for the difference in thrombogenicity between the three stents. Moreover, stagnation zones of more or less large size also appeared between the wires of both the Casper stent and the Wallstent, while almost none could be observed in the Protégé RX stent. The cell distributions also display significant differences. The recirculation and stagnation regions around the struts and between the crossing display elevated platelet concentrations in general (**Figure 2B**), primarily due to efficiently retaining margined platelets from the bulk flow. These regions can exhibit two to four times higher platelet count. In summary, the macroscale simulation were instrumental in providing solid insight in the difference in thrombogenicity of the three

clinically-used stents, which are notably explained by differences in velocities, platelet concentration and stagnation zones around the stent struts.

The wire crossings are the main source of the thrombogenicity of braided stents. One major difference between laser-cut and braided stents is the presence of wire crossings in the latter, which might represent the main source of thrombogenicity. Fluorescent images showed that platelets accumulated preferentially at the wire crossings of the Casper stent and the Wallstent, as compared to areas further away from the crossings (**Figure 3A**). These observations were confirmed by quantification of the fluorescence at the crossings and between for the Casper stent (crossing: $9.5 \pm 4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; non-crossing: $1.8 \pm 1.8 \times 10^1 \mu\text{m}^2$; $p=0.0143$) and the Wallstent (crossing: $11.5 \pm 5.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; non-crossing: $7.4 \pm 2.7 \times 10^1 \mu\text{m}^2$; $p=0.0381$), which showed that crossings are hot spots of thrombus formation (**Figure 3B, C**). To obtain more details, we subdivided the wires of the crossings into proximal (P) wires in contact with the wall of the chamber and distal (D) wires further away from the wall. Fluorescent images revealed that the proximal wires of both the Casper stent and the Wallstent presented more platelet thrombi than the distal wires (**Figure 3D**). This was confirmed by quantification of the DiOC₆ staining (Casper proximal: $0.89 \pm 0.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Casper distal: $0.03 \pm 0.01 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0001$; Wallstent proximal: $0.16 \pm 0.04 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; Wallstent distal: $0.03 \pm 0.02 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0143$), which was increased respectively 30 and 5 times on the proximal wires (**Figure 3E, F**). To determine how platelets attach to these hot spots, we perfused platelet-poor plasma (PPP) through both stents and immunostained for fibrinogen, an important adhesive plasma protein. Fluorescent images showed that fibrinogen adsorbed mainly on the proximal wires of the crossings in both the Casper stent and the Wallstent (**Figure 3G, H**). Thus, we identified the proximal wires of the crossings of braided

stents as a thrombogenic hot spot. These hot spots of platelet accumulation most likely resulted from the adsorption of plasma proteins, including fibrinogen.

Integrin α IIb β 3 and the TxA2 pathway play a central role in regulating thrombus formation in braided carotid stents. To elucidate the molecular mechanism through which platelets accumulate in braided stents, we used a pharmacological approach. We started with aspirin, which is the standard treatment after carotid stenting in tandem lesion patients. Platelet accumulation was sensitive to aspirin in both Casper stents (control: $119.6 \pm 24 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; aspirin: $54 \pm 10.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0157$) and Wallstents (control: $61 \pm 11 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; aspirin: $35.9 \pm 8.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p>0.05$), pointing to a role of TxA2 release from platelets in thrombus formation in the stents (**Figure 4A-D**). Similarly, the integrin α IIb β 3 blocker abciximab profoundly impaired platelet adhesion and aggregation in Casper stents (control: $46.8 \pm 4.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; abciximab: $4.5 \pm 1.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p<0.0001$) (**Figure 4E, F**) and Wallstents (control: $33.7 \pm 4.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; abciximab: $8.6 \pm 1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0001$) (**Figure 4G, H**). These results showed that integrin α IIb β 3 and the TxA2 pathway play an important part in platelet accumulation in both the Casper stent and the Wallstent.

The proximal wires of braided stents generate regions of low wall shear rate (WSR) triggering thrombus formation. To determine why the proximal wires of the wire crossings of braided stents are more thrombogenic than the distal wires, we turned to an *in silico* approach. CFD analyses of the Casper stent indicated that the WSR values around the distal wires reached $1,800 \text{ s}^{-1}$, while those near the proximal wires did not exceed 14 s^{-1} , creating pockets of very low shear (**Figure 5A**). In the Wallstent, the distal wires generated a WSR of about 140 s^{-1} while the levels around the proximal wires did not exceed 2 s^{-1} , leading again to

a stagnant zone (**Figure 5B**). In summary, the proximal wires of the wire crossings of a Casper stent or a Wallstent appeared to generate low WSR regions favoring thrombus formation.

DISCUSSION

We developed a novel pre-clinical model that allows to evaluate the thrombogenicity of clinically-used stents. A major result of this work is the identification of a higher thrombogenic potential of braided stents when compared to laser-cut stents. We also evidenced a difference in thrombogenicity between the braided stents, and identified the wire crossings as hot spot of thrombus formation. Our results point the stent design and its ability to modify the local rheology as a major trigger to initiate stent thrombosis.

A main result of this study is that carotid braided stents are much more thrombogenic than laser-cut stents. While both type of stents facilitate platelet adhesion, activation and spreading, only braided stents support massive platelet aggregation. This difference in thrombogenicity is not explained by the material used to make the stents, as both the Casper and the Protégé RX are made of nitinol and present very distinct thrombogenicity. The reason why braided stents are more thrombogenic than laser-cut stents is mainly explained by local modifications of the blood flow. Indeed, at the hemodynamic level, *in silico* macroscale simulations highlighted recirculation of flow current lines near the proximal and distal meshes of both braided stents, when almost none can be observed for the Protégé RX laser-cut stent, largely explaining the difference in thrombogenicity. This is not a surprise, as the Protégé RX possesses only one layer of metal, when the Wallstent has two and the Casper four, as it is dual-layered. This result is also in agreement with the fact that the wire crossings present stagnation regions, where platelets are slowed down and can more easily attach to the stent surface.

Another important result of this work is that the Casper stent is more thrombogenic than the Wallstent. This observation is in agreement with clinical data, highlighting the higher thrombogenicity of the dual-layered Casper compared to mono-layered stents such as the Wallstent [16–18]. We observed that the external wires of the Casper stent supported more thrombus formation when compared to the Wallstent. This result is not explained by the size of the wires, which is a known thrombogenic factor of stents, as it is recognized that thrombogenicity increases with struts size [30,31]. Indeed, according to the manufacturers' data, the metal wires of the Casper stents are 15 μm narrower than the Wallstent, with 180 μm and 195 μm , respectively. A potential explanation for the difference in thrombogenicity comes from the material, as the Casper stent is made of nitinol while the Wallstent is made of elgiloy. One could speculate that nitinol could adsorb more efficiently plasma proteins such as fibrinogen, which is a trigger to recruit circulating platelets. Another hypothesis comes from the global structure of the stent, as the Casper is dual-layered while the Wallstent is single-layered. The macroscale simulation in this manuscript shows a larger blood perturbation in presence of the Casper stent, when compared to the Wallstent. Thus, one is tempted to hypothesise that the inner layer of the Casper stent could influence the blood cell distribution, notably the platelets and increase their presence close to the external mesh, thereby increasing the thrombogenicity of the Casper stent. Further in-depth macro- and microscale simulations should be executed to test this hypothesis. Additionally, it could be interesting to evaluate stents of similar designs with or without the inner grid in our macrofluidic platform.

For both braided stents, the thrombogenicity was not homogeneously distributed on the stent surface, as hot spots of thrombus formation were found to be located at the crossing of metal wires. Proximal wires, in contact with the vessel wall, are more thrombogenic than the distal ones, in contact with the lumen. CFD revealed that very low WSR were found close

to the proximal meshes, while it was a tad higher around the distal wires for both Casper and Wallstent. Furthermore, even though a very low platelet concentration is found around the external wires, macroscale simulations identified the blood stagnation areas between distal and proximal wires, which contribute to explain the higher thrombogenicity of these regions.

The increased thrombogenicity found at the crossing of braided stents is most likely explained by a preferential region of fibrinogen adsorption as evidenced by immunofluorescence staining. The reason why fibrinogen adsorbs better to the metal in this region probably comes from the stagnation zone that facilitates the process of plasmatic protein adsorption. Fibrinogen is a major protein to allow platelet attachment through $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, notably under low shear regime found at the wire crossings. Reducing fibrinogen binding to the stent struts represents thus an attractive strategy to lower stent thrombogenicity. This could be achieved by passivating stents with a neutral plasmatic protein, such as albumin. An alternative would be to adapt the stent design to avoid the low shear pockets and prevent fibrinogen adsorption and platelet adhesion.




We observed that abciximab efficiently reduces thrombus formation on both braided stents. This is not surprising as abciximab targets $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, a major integrin ensuring platelet adhesion and aggregation on immobilised fibrinogen, which has been shown to be adsorbed on the stents. Thus abciximab, or any other $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ blocker, appears as an interesting pharmacological strategy to prevent ST. The reason why this class of antiplatelet agent is not recommended for the prevention of ST relies on its high risk of bleeding, which is particularly deleterious in the brain. Aspirin, the standard of care to prevent carotid ST [32], was less effective than abciximab, but significantly reduced platelet aggregation on the Casper stent, and presented a decreased trend on the Wallstent. This modest antithrombotic potential of aspirin is likely to explain the elevated incidence of 20 % observed in tandem lesion patients

[5,9]. There is clearly a need to identify better antiplatelet agent which would efficiently prevent ST with an acceptable risk of bleeding, and we propose that our model opens the possibility to screen new pharmacological agents.

In conclusion, we studied the intrinsic thrombogenicity of three stents used in clinic, with the help of a new macrofluidic system that allows the use of a chamber mimicking the human carotid artery. We observed that two braided stents are more thrombogenic than a laser-cut stent, and that this difference results from the braiding of the stents that permits fibrinogen adsorption on the metal, thus facilitating platelet adhesion and aggregation. The main trigger of this adsorption seems to be the low wall shear rate at the mesh crossing, as well as pocket of blood stagnation. We propose that our macrofluidic platform is particularly well-suited to better appreciate the mechanism of the thrombogenicity of stents, and could be used for pre-clinical testing lowering the use of large animal models frequently used for this purpose.

TABLE

Table 1: Description of the three commercial stents

Name of the stent	Material	Mesh size (μm)	Picture
Casper	Nitinol	180*	
Wallstent	Cobalt-chromium	195*	
Protégé RX	Nitinol	170**	

* data from suppliers

** measured in our laboratory

ETHICS

This study was approved by the French Ethics Committee of Est II (Ref: 23.02086.000212; n° ID-RCB: 2023-A01318-37) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank ANR GESTE and the French Federation of Cardiology for funding. They also acknowledge the helpful support of the Electron Microscopy Team of UMR_S1255 in obtaining high resolution scanning electron microscope images.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors have no competing interests to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Any additional information required to reanalyse the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

BIBLIOGRAPHY

1. Kaplan, Z.S.; Jackson, S.P. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *Hematology* **2011**, 51–61, doi:10.1182/asheducation-2011.1.51.
2. Nesbitt, W.S.; Mangin, P.; Salem, H.H.; Jackson, S.P. The Impact of Blood Rheology on the Molecular and Cellular Events Underlying Arterial Thrombosis. *J Mol Med* **2006**, *84*, 989–995, doi:10.1007/s00109-006-0101-1.
3. Nesbitt, W.S.; Westein, E.; Tovar-Lopez, F.J.; Tolouei, E.; Mitchell, A.; Fu, J.; Carberry, J.; Fouras, A.; Jackson, S.P. A Shear Gradient–Dependent Platelet Aggregation Mechanism Drives Thrombus Formation. *Nat Med* **2009**, *15*, 665–673, doi:10.1038/nm.1955.
4. Donkor, E.S. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Research and Treatment* **2018**, *2018*, 1–10, doi:10.1155/2018/3238165.
5. Pop, R.; Zinchenko, I.; Quenardelle, V.; Mihoc, D.; Manisor, M.; Richter, J.S.; Severac, F.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Rouyer, O.; et al. Predictors and Clinical Impact of Delayed Stent Thrombosis after Thrombectomy for Acute Stroke with Tandem Lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* **2019**, *ajnr*;ajnr.A5976v1, doi:10.3174/ajnr.A5976.
6. Allard, J.; Delvoe, F.; Pop, R.; Labreuche, J.; Maier, B.; Marnat, G.; Sibon, I.; Zhu, F.; Lapergue, B.; Consoli, A.; et al. 24-Hour Carotid Stent Patency and Outcomes After Endovascular Therapy: A Multicenter Study. *Stroke* **2023**, *54*, 124–131, doi:10.1161/STROKEAHA.122.039797.
7. Watts, T.E.; Chatterjee, A.; Leeser, M.A. Stent Thrombosis: Early, Late, and Very Late. In *Cardiovascular Thrombus*; Academic Press, 2018; pp. 217–224 ISBN 978-0-12-812615-8.
8. Lotfi, A.; Reejhsinghani, R. Prevention of Stent Thrombosis: Challenges and Solutions. *VHRM* **2015**, *11*, 93–106, doi:10.2147/VHRM.S43357.
9. Pop, R.; Hasiu, A.; Mangin, P.H.; Severac, F.; Mihoc, D.; Nistoran, D.; Manisor, M.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Gheoca, R.; et al. Postprocedural Antiplatelet Treatment after Emergent Carotid Stenting in Tandem Lesions Stroke: Impact on Stent Patency beyond Day 1. *AJNR Am J Neuroradiol* **2021**, *42*, 921–925, doi:10.3174/ajnr.A6993.
10. Lau, K.-W.; Mak, K.-H.; Hung, J.-S.; Sigwart, U. Clinical Impact of Stent Construction and Design in Percutaneous Coronary Intervention. *American Heart Journal* **2004**, *147*, 764–773, doi:10.1016/j.ahj.2003.12.007.
11. Kern, A.; Mangin, P. Critical Analysis of in Vitro and Ex Vivo Experimental Models Investigating the Intrinsic Thrombogenicity of Clinically-Used Stents. In *European Symposium on Vascular Biomaterial Congress Book*; 2023; pp. 92–103.
12. Jaffer, I.H.; Fredenburgh, J.C.; Hirsh, J.; Weitz, J.I. Medical Device-Induced Thrombosis: What Causes It and How Can We Prevent It? *J Thromb Haemost* **2015**, *13*, S72–S81, doi:10.1111/jth.12961.
13. Kolandaivelu, K.; Swaminathan, R.; Gibson, W.J.; Kolachalama, V.B.; Nguyen-Ehrenreich, K.-L.; Giddings, V.L.; Coleman, L.; Wong, G.K.; Edelman, E.R. Stent Thrombogenicity Early in High-Risk Interventional Settings Is Driven by Stent Design and Deployment and Protected by Polymer-Drug Coatings. *Circulation* **2011**, *123*, 1400–1409, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.003210.
14. Zafar, M.U.; Bravo-Cordero, J.J.; Torramade-Moix, S.; Escolar, G.; Jerez-Dolz, D.; Lev, E.I.; Badimon, J.J. Effects of Electret Coating Technology on Coronary Stent Thrombogenicity. *Platelets* **2022**, *33*, 312–319, doi:10.1080/09537104.2021.1912313.
15. Han, Q.; Shea, S.M.; Arleo, T.; Qian, J.Y.; Ku, D.N. Thrombogenicity of Biomaterials Depends on Hemodynamic Shear Rate. *Artificial Organs* **2022**, *46*, 606–617, doi:10.1111/aor.14093.
16. Pfaff, J.A.R.; Maurer, C.; Broussalis, E.; Janssen, H.; Blanc, R.; Dargazanli, C.; Costalat, V.; Pötin, M.; Runck, F.; Berlis, A.; et al. Acute Thromboses and Occlusions of Dual Layer Carotid Stents in Endovascular Treatment of Tandem Occlusions. *J NeuroIntervent Surg* **2020**, *12*, 33–37, doi:10.1136/neurintsurg-2019-015032.
17. Yilmaz, U.; Körner, H.; Mühl-Benninghaus, R.; Simgen, A.; Kraus, C.; Walter, S.; Behnke, S.; Faßbender, K.; Reith, W.; Unger, M.M. Acute Occlusions of Dual-Layer Carotid Stents After Endovascular Emergency Treatment of Tandem Lesions. *Stroke* **2017**, *48*, 2171–2175, doi:10.1161/STROKEAHA.116.015965.

18. Klail, T.; Kurmann, C.; Kaesmacher, J.; Mujanovic, A.; Piechowiak, E.I.; Dobrocky, T.; Pilgram-Pastor, S.; Scutelnic, A.; Heldner, M.R.; Gralla, J.; et al. Safety and Efficacy of Carotid Artery Stenting with the CGuard Double-Layer Stent in Acute Ischemic Stroke. *Clin Neuroradiol* **2023**, *33*, 237–244, doi:10.1007/s00062-022-01209-3.
19. Otto, M.; Franzen, A.; Hansen, T.; Kirkpatrick, C.J. Modification of Human Platelet Adhesion on Biomaterial Surfaces by Protein Preadsorption under Static and Flow Conditions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2004**, *15*, 35–42, doi:10.1023/B:JMSM.0000010095.19693.67.
20. Jackson, S.P.; Nesbitt, W.S.; Westein, E. Dynamics of Platelet Thrombus Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 17–20, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x.
21. Ruggeri, Z.M. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation* **2009**, *16*, 58–83, doi:10.1080/10739680802651477.
22. Bark, D.L.; Ku, D.N. Wall Shear over High Degree Stenoses Pertinent to Atherothrombosis. *Journal of Biomechanics* **2010**, *43*, 2970–2977, doi:10.1016/j.jbiomech.2010.07.011.
23. Wang, Y.; Zhan, J.; Bian, W.; Tang, X.; Zeng, M. Local Hemodynamic Analysis after Coronary Stent Implantation Based on Euler-Lagrange Method. *J Biol Phys* **2021**, *47*, 143–170, doi:10.1007/s10867-021-09571-y.
24. Gay, M.; Zhang, L.T. Numerical Studies of Blood Flow in Healthy, Stenosed, and Stented Carotid Arteries. *Numerical Methods in Fluids* **2009**, *61*, 453–472, doi:10.1002/fld.1966.
25. Jiménez, J.M.; Davies, P.F. Hemodynamically Driven Stent Strut Design. *Ann Biomed Eng* **2009**, *37*, 1483, doi:10.1007/s10439-009-9719-9.
26. Kern, A.Y.; Kreinin, Y.; Charle, L.; Epsrhein, M.; Korin, N.; Mangin, P.H. A Macrofluidic Model to Investigate the Intrinsic Thrombogenicity of Clinically Used Stents and Develop Less Thrombogenic Stents. *Heliyon* **2024**, e26550, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26550.
27. Benetos, A.; Simon, A.; Levenson, J.; Lagneau, P.; Bouthier, J.; Safar, M. Pulsed Doppler: An Evaluation of Diameter, Blood Velocity and Blood Flow of the Common Carotid Artery in Patients with Isolated Unilateral Stenosis of the Internal Carotid Artery. *Stroke* **1985**, *16*, 969–972, doi:10.1161/01.STR.16.6.969.
28. Ohlmann, P.; Eckly, A.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Offermanns, S.; Gachet, C. ADP Induces Partial Platelet Aggregation without Shape Change and Potentiates Collagen-Induced Aggregation in the Absence of Gαq. *Blood* **2000**, *96*, 2134–2139, doi:10.1182/blood.V96.6.2134.
29. Závodszky, G.; van Rooij, B.; Azizi, V.; Hoekstra, A. Cellular Level In-Silico Modeling of Blood Rheology with An Improved Material Model for Red Blood Cells. *Front Physiol* **2017**, *8*, 563, doi:10.3389/fphys.2017.00563.
30. Gori, T.; Polimeni, A.; Indolfi, C.; Räber, L.; Adriaenssens, T.; Münzel, T. Predictors of Stent Thrombosis and Their Implications for Clinical Practice. *Nat Rev Cardiol* **2019**, *16*, 243–256, doi:10.1038/s41569-018-0118-5.
31. Hara, H.; Nakamura, M.; Palmaz, J.C.; Schwartz, R.S. Role of Stent Design and Coatings on Restenosis and Thrombosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 377–386, doi:10.1016/j.addr.2006.01.022.
32. Pop, R.; Severac, F.; Hasiu, A.; Mihoc, D.; Mangin, P.H.; Chibbaro, S.; Simu, M.; Tudor, R.; Gheoca, R.; Quenardelle, V.; et al. Conservative versus Aggressive Antiplatelet Strategy for Emergent Carotid Stenting during Stroke Thrombectomy. *Interv Neuroradiol* **2022**, 159101992210831, doi:10.1177/15910199221083112.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Evaluation of the intrinsic thrombogenicity of three clinically used carotid stents.

(A) Representation of the closed circuit through which hirudinated human whole blood is perfused, including the flow chamber, a peristaltic pump, a water bath at 37°C and a fluorescence microscope. (B) Representation of the chamber with (right) and without (left) a stent. (C) The three carotid stents evaluated in our model: the Casper stent (left), the Protégé RX stent (middle) and the Wallstent (right). Scale bar: 5 mm. (D) Internal carotid artery region with or without a stent after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood labeled with DiOC₆. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. (E) Quantification of the platelet accumulation in the internal carotid artery region (**** $p < 0.0001$; * $p = 0.0373$) ($n = 4-8$). Values are the mean \pm the standard error of the mean. (F) SEM images showing aggregates on the Casper stent (upper) and Wallstent (middle), both rich in highly activated platelets. The Protégé RX stent (lower) displays a monolayer of spread platelets. The white arrows indicate filopodia. Scale bars: 150 μm (right) and 2 μm (left).

Figure 2: Blood flow velocity and platelet concentration play a role in the intrinsic thrombogenicity of stents.

(A) Streamlines colored according to the average flow rate superimposed on a side view of the Casper stent (upper), Wallstent (middle) and Protégé RX stent (lower). The flow rates were averaged across the Y-axis and over multiple time steps and the cell positions were recorded at the final time step ($t = 1\text{s}$). Proximal (P) and distal (D) wires of the wire crossings are indicated. (B) Average platelet volume concentration across the X- and Z-axes superimposed on a side view of the Casper stent (upper), Wallstent (middle) and

Protégé RX stent (lower). The results were averaged across the Y-axis and over multiple time steps. The blood flow was in the positive X-direction.

Figure 3: Identification of the hot spots of platelet accumulation in braided stents. (A) Zoomed images of the lumen of the carotid artery chamber implanted with a Casper stent (left) or a Wallstent (right) after one hour of perfusion of hirudinized human whole blood labeled with DiOC₆. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 1 mm. **(B)** Quantification of the platelet accumulation at the wires crossing and in between in the internal carotid artery region in a Casper stent (* p = 0.0141) (n = 4). Values are the mean ± the standard error of the mean. **(C)** Quantification of the platelet accumulation at the wires crossing and in between in the internal carotid artery region in a Wallstent stent (* p = 0.0381) (n = 4). Values are the mean ± the standard error of the mean. **(D)** Comparison in the Casper stent (upper) and Wallstent (lower) of the proximal (P) and distal (D) wires of the wire crossings, in contact with the wall of the chamber and the lumen, respectively. Frontal schematic representation of the proximal and distal wires in both stents. **(E)** Quantification of the platelet accumulation on the proximal and distal wires in the internal carotid artery region in a Casper stent (***) p = 0.0001 (n = 4). Values are the mean ± the standard error of the mean. **(F)** Quantification of the platelet accumulation on the proximal and distal wires in the internal carotid artery region in a Wallstent stent (* p = 0.0143) (n = 4). Values are the mean ± the standard error of the mean. **(G)** Immunofluostaining of a Casper stent after PPP perfusion for one hour. Control (left) and fibrinogen (right). Scale bar: 50 μm. **(H)** Immunofluostaining of a Wallstent after PPP perfusion for one hour. Control (left) and fibrinogen (right). Scale bar: 50 μm.

Figure 4: Pharmacological inhibition of platelet accumulation in two clinically used carotid stents. Hirudinated human whole blood labeled with DiOC₆ was perfused for one hour through the flow system implanted with a Casper stent or a Wallstent, in the presence or absence of aspirin (50 µg/mL) (A-D) or abciximab, an αIIbβ₃ inhibitor (40 µg/mL) (E-H). Platelets appear in green. Values are the mean ± the standard error of the mean. Scale bars: 2 mm. **(A)** Pictures of the lumen of a Casper stent placed in the internal carotid artery region after perfusion of blood with (right) and without (left) aspirin. **(B)** Quantification of the platelet accumulation in a Casper stent (* p = 0.0157) (n = 6). **(C)** Pictures of the lumen of a Wallstent placed in the internal carotid artery region after perfusion of blood with (right) and without (left) aspirin. **(D)** Quantification of the platelet accumulation in a Wallstent (p = 0.0521) (n = 6). **(E)** Pictures of the lumen of a Casper stent placed in the internal carotid artery region after perfusion of blood with (right) and without (left) abciximab. **(F)** Quantification of the platelet accumulation in a Casper stent (**** p < 0.0001) (n = 5). **(G)** Pictures of the lumen of a Wallstent placed in the internal carotid artery region after perfusion of blood with (right) and without (left) abciximab. **(H)** Quantification of the platelet accumulation in a Wallstent (***) p = 0.0001) (n = 7).

Figure 5: Characterization of the thrombogenic flows generated around the proximal wires of the wire crossings in braided stents. **(A)** Simulation of the blood flow through a Casper stent showing very low wall shear rates (WSR) near the proximal (P) wires (14 s⁻¹) and higher values near the distal (D) ones (1,800 s⁻¹). The inner mesh of the Casper stent displays more important WSR (up to 2,500 s⁻¹). **(B)** Simulation of the blood flow through a Wallstent showing extremely low WSR near the proximal (P) wires (2 s⁻¹) and higher values near the distal (D) ones (140 s⁻¹).

Figure 1

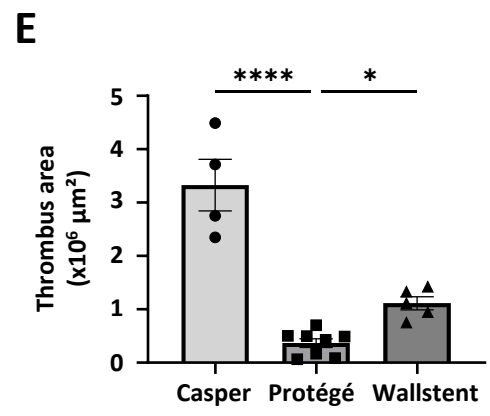
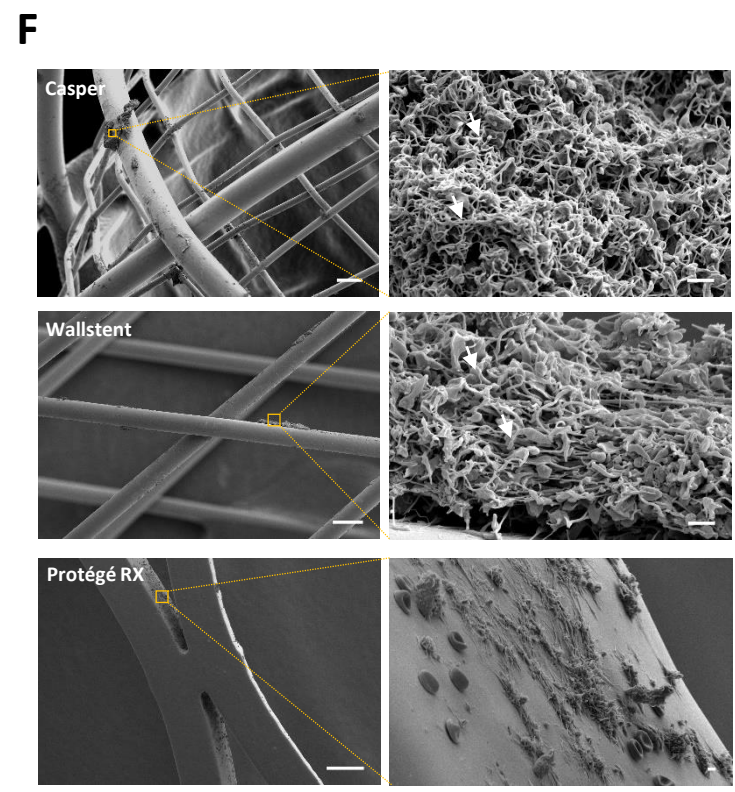
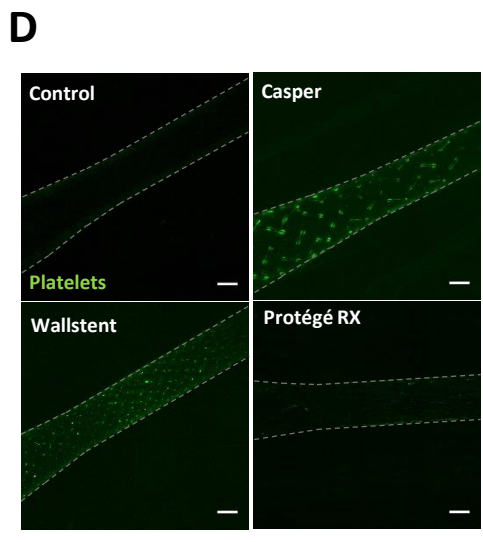
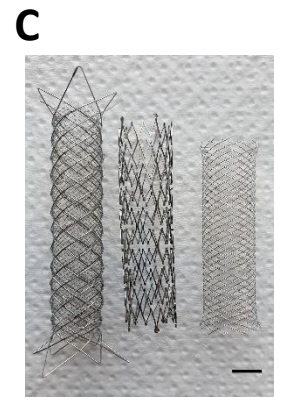
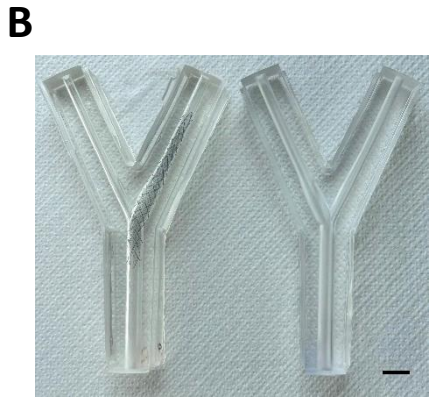
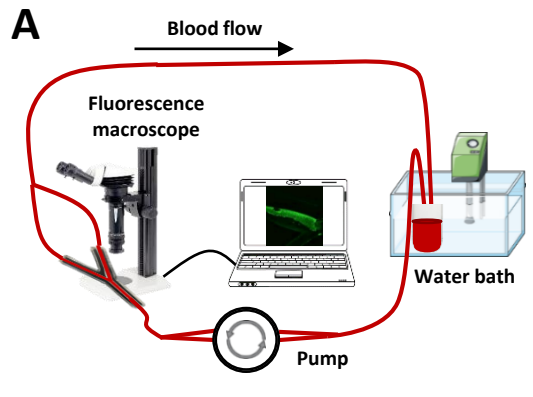


Figure 2

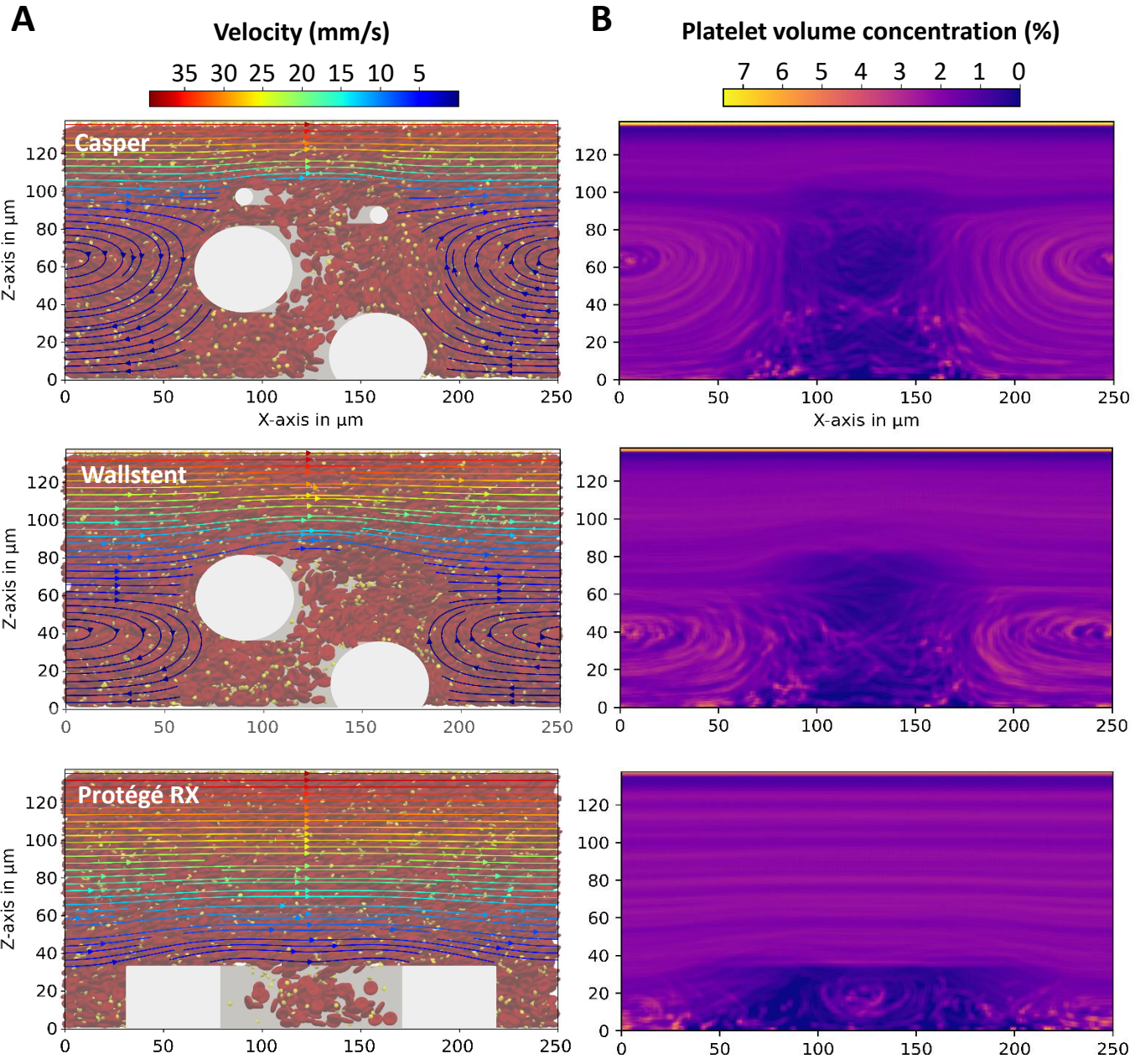


Figure 3

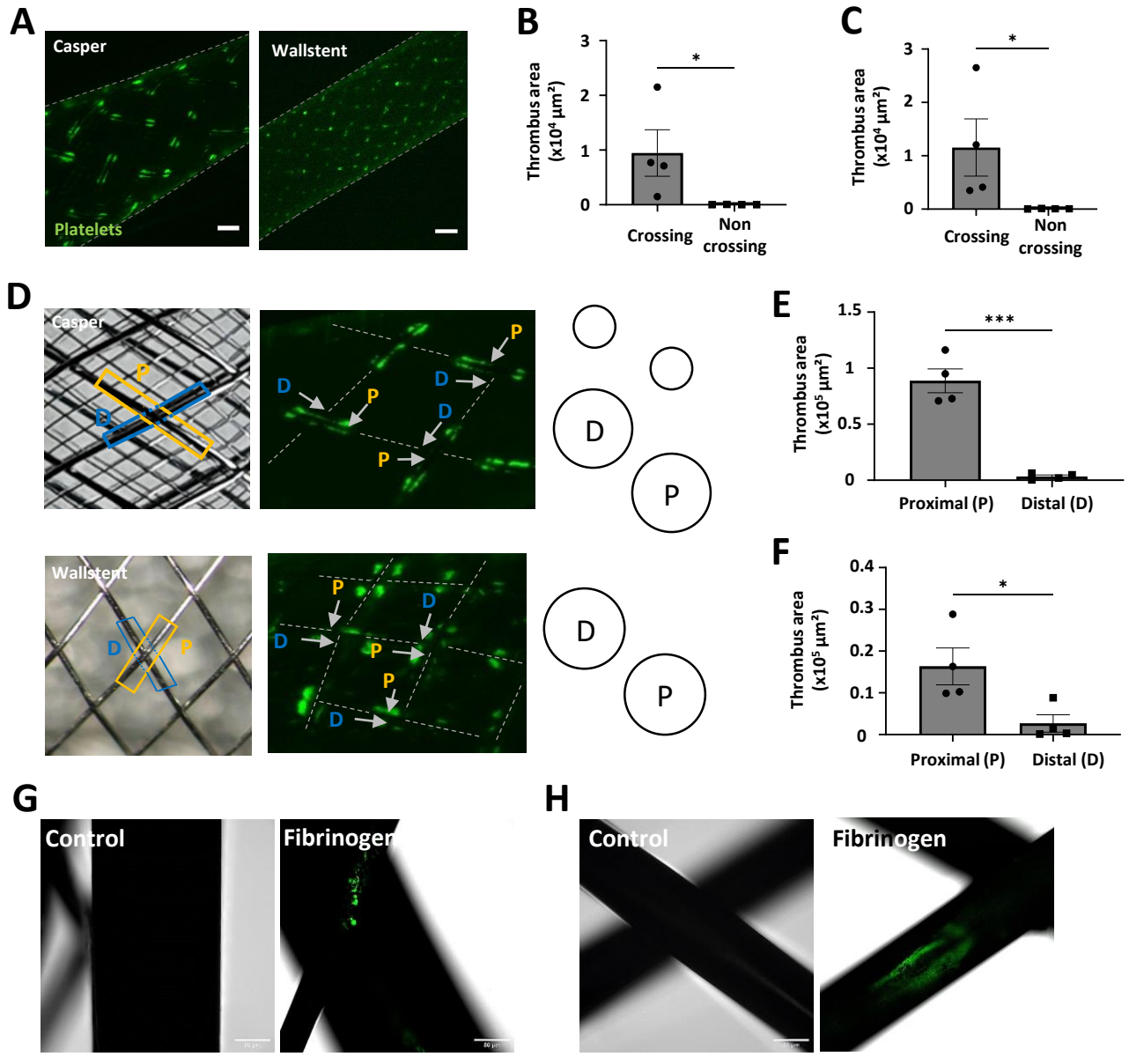


Figure 4

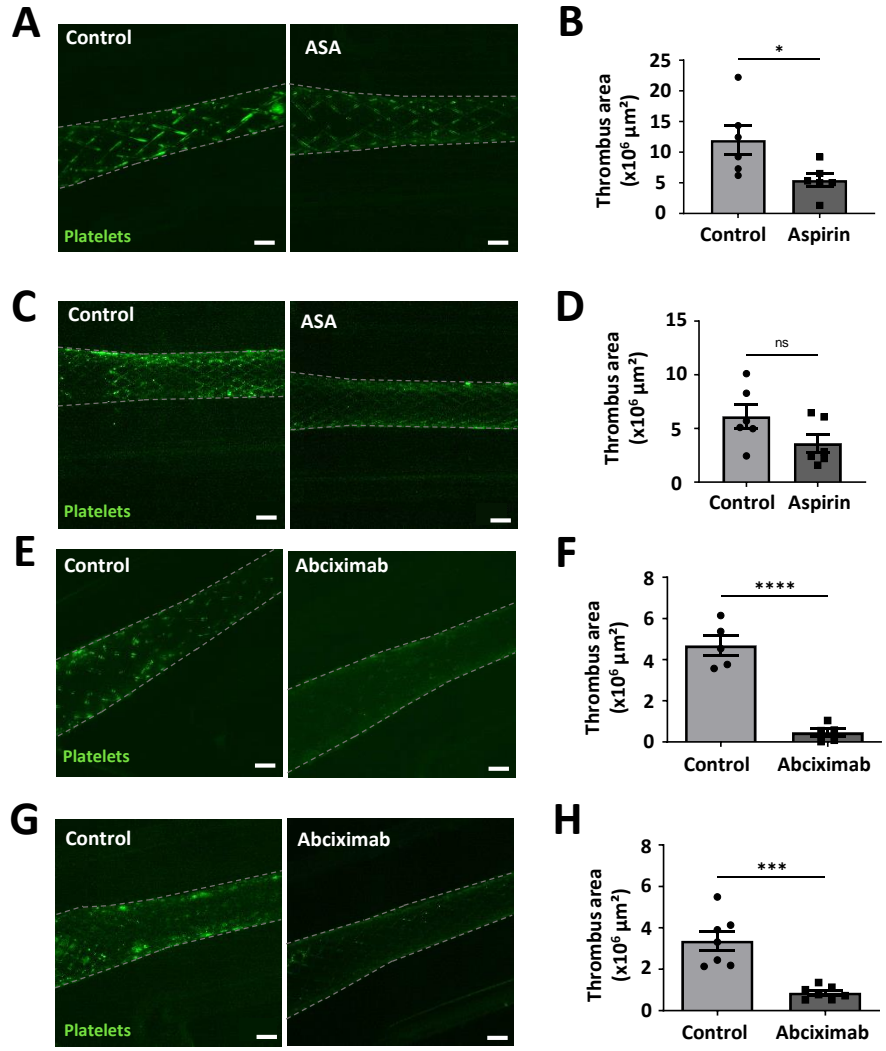
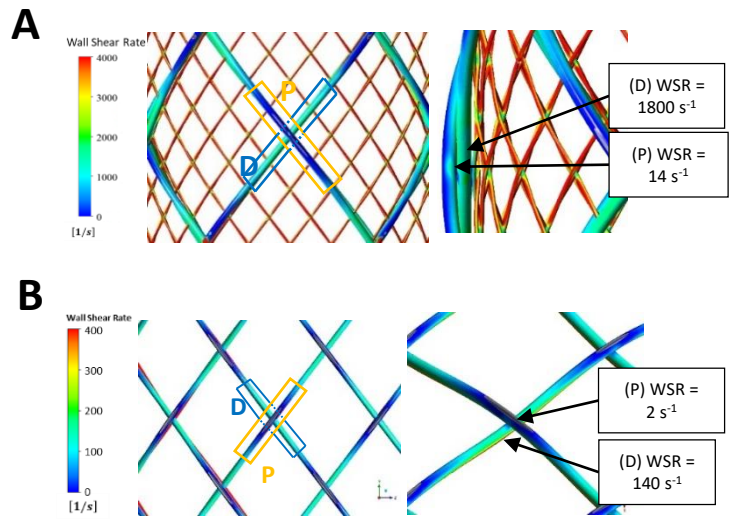


Figure 5



Conclusion

Dans ce manuscrit, nous avons caractérisé la thrombogénicité intrinsèque des mailles en contact avec la paroi de trois stents carotidiens utilisés en clinique. Nous avons observé que les stents tressés (Casper, Wallstent) sont plus thrombogènes que les stents coupés au laser (Protégé), ce qui coïncide avec les données cliniques. De plus, nous avons remarqué que les zones de croisements des mailles des stents tressés sont les zones de formation privilégiées des thrombi. Leur formation s'est avérée sensible à l'aspirine et aux antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. La dynamique des fluides assistée par ordinateur (CFD : *computational fluid dynamic*) a indiqué que les taux de cisaillement au niveau des croisements des mailles sont particulièrement bas, ce qui pourrait favoriser l'adhérence et l'agrégation plaquettaire. De même, des simulations *in silico* ont montré une perturbation des flux et de la vitesse du sang au niveau des croisements des mailles, ce qui n'est pas retrouvé sur un stent coupé au laser.

En résumé, mes résultats confirment que le design du stent et son impact sur la rhéologie jouent un rôle majeur dans sa thrombogénicité. Ce travail confirme que le modèle macrofluidique est particulièrement bien adapté à l'évaluation de la thrombogénicité des stents cliniques actuels et nouvellement développés, et pourrait aider au développement de stents moins thrombogènes.

**Les stents carotidiens influencent l'adhérence
plaquettaire à la paroi**

Publication 5 :

**« Carotid single- and dual-layer stents reduce the wall adhesion of platelets by influencing
flow and cellular transport »**

Christian J. Spieker^{a,1}, Axelle Y. Kern^{b,1}, Netanel Korin^c, Pierre H. Mangin^b, Alfons G. Hoekstra^a,
Gábor Závodszy^a

^aComputational Science Lab, Informatics Institute, Faculty of Science, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ^bINSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ^cDepartment of Biomedical Engineering, Technion—Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

¹ Co-first authors

Soumis, Computers in Biology and Medicine.

Introduction

20 % des cas d'AVC ischémiques sont consécutifs à la rupture d'une plaque d'athérosclérose au niveau de la carotide. En plus de traiter l'AVC par thrombolyse et/ou thrombectomie pour permettre une recanalisation de l'artère cérébrale, les cliniciens implantent un stent dans la carotide pour éviter une récurrence. Les stents à double couche ont été introduits comme une alternative aux stents à simple couche pour le stenting (non) urgent de l'artère carotide. Bien que la structure bicouche présente l'avantage de réduire le prolapsus de la plaque à travers les mailles du stent et, par conséquent, la survenue d'embolies périprocédurales, de premiers résultats cliniques indiquent que cette nouvelle génération de stent serait plus thrombogène.

L'objectif de ce cinquième article a été de comparer *in vitro* et *in silico* l'influence de la structure du stent sur la répartition cellulaire. On s'est intéressé à l'impact de l'organisation des mailles de deux stents carotidiens utilisés en clinique, le Wallstent et le Casper, qui sont respectivement simple et double couche. Pour cela, nous avons utilisé le dispositif macrofluidique précédemment décrit dans l'article 2 (Kern *et al*, Heliyon 2024). Avant l'implantation du stent, la chambre carotidienne a été recouverte soit de collagène, soit de matériel de plaque d'athérosclérose humaine, afin de reproduire la thrombogénicité d'une artère malade et donc de pouvoir mimer une thrombose de stent. Les simulations *in silico* ont modélisé l'écoulement et la position des cellules sanguines près des mailles du stent, au niveau de la paroi de la chambre.

Ce travail, pour lequel je signe co-premier auteur, a été soumis pour publication dans *Computers in Biology and Medicine* en juin 2024.

Carotid single- and dual-layer stents reduce the wall adhesion of platelets by influencing flow and cellular transport

Christian J. Spieker^{a,1}, Axelle Y. Kern^{b,1}, Netanel Korin^c, Pierre H. Mangin^b, Alfons G. Hoekstra^a and Gábor Závodszy^{a,*}

^aComputational Science Lab, Informatics Institute, Faculty of Science, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

^bINSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^cDepartment of Biomedical Engineering, Technion—Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

ARTICLE INFO

Keywords:

carotid artery stenting
single-layer stent
dual-layer stent
stent thrombosis
cellular blood

ABSTRACT

An ongoing thrombosis on a ruptured atherosclerotic plaque in the carotid may cause stroke. The primary treatment for patients with tandem lesion is stenting. Dual-layer stents have been introduced as an alternative to single-layer stents for elective and emergent carotid artery stenting. While the dual-layer structure shows promise in reducing plaque prolapse through the stent struts and with it the occurrence of post-procedural embolism, there are early signs that this newer generation of stents is more thrombogenic. We investigate a single- and a dual-layer stent design to assess their influence on a set of thrombosis-related flow factors in a combined experimental and simulation setup. The *in vitro* results reveal that both stents reduce thrombus formation when human anticoagulated whole blood was perfused through macrofluidic flow chambers coated with either collagen or human atherosclerotic plaque homogenates. Simulations predict that the primary cause is reduced platelet presence in the vicinity of the wall, due to the influence of stents on flow and cellular transport. Both stents significantly alter the near-wall flow conditions, modifying shear rate, shear gradient, cell-free zones, and platelet availability. Additionally, the dual-layer stent has further increased local shear rates on the inner struts. It also displays increased stagnation zones and reduced recirculation between the outer-layer struts. Finally, over atherosclerotic plaque coating it shows further reduced adhesion. The novel approach presented here can be used to improve the design optimization process of cardiovascular stents in the future by allowing an in-depth study of the emerging flow characteristics and agonist transport.

1. Introduction

Vascular stents are commonly deployed in an angioplastic procedure to treat the occlusion or stenosis of arteries, such as the coronary, femoral or carotid artery. In this procedure, the stent is expanded at the site of obstruction to restore the vascular lumen and re-establish unrestricted blood flow to avoid otherwise potentially fatal side effects of vascular stenosis such as heart attack or stroke [16, 26, 68, 5, 25]. An ongoing thrombosis in the carotid artery has a high likelihood of leading to a stroke, due to the proximity to the brain. The pathologic flow conditions of the stenosed segment favor thrombosis and ultimately embolism. The main treatment options for carotid stenosis are carotid endarterectomy and carotid artery stenting (CAS) [36]. Elective CAS is performed on patients with carotid stenosis to decrease the possibility for stroke in the future and emergent CAS can be applied as a treatment during acute ischemic stroke [65]. Additionally, CAS can be deployed in combination with cerebral protection devices to act as a filter reducing the incidence of microemboli that disseminate during the procedure and increase the risk for neurological complications, such as periprocedural stroke [2, 64]. However, the utilization of

vascular stents introduces additional risks, stent thrombosis (ST) being among the most common complications.

Acute early carotid ST, occurring within 24 hours post-stenting, is a potentially fatal complication with a recorded incidence of 0.5 - 0.8% in elective CAS [40]. ST following emergent CAS during stroke thrombectomy demonstrates significantly higher occurrences, with a recorded incidence between 8 to 28%, depending on the accompanying treatment [46, 48, 45]. Advancements in antithrombotic therapy, most notably dual-antiplatelet therapy, have decreased the risk for early ST, occurring within 30 days post-stenting. At the same time such therapies can have an adverse effect by increasing the likelihood for bleeding complications, especially for stroke patients, in whom hemorrhagic stroke transformation may occur [58]. In addition to this, improvements in stent deployment techniques, such as post-dilation, have further decreased early ST risk. Nevertheless, ST, in particular late and very late ST (between 30 days - 1 year and after 1 year post-stenting, respectively), remains a common fatal cause of post-stenting complications, where the rapid closure of the vessel leads to stroke, acute myocardial infarction or sudden cardiac death depending on the location of the vessel [10, 43, 23, 62].

Major factors that influence the risk for ST are patient specific characteristics, the material of the stent (DES, bare metal stent (BMS) or bioresorbable vascular scaffolds (BVS)) and the accompanying therapy. Additional factors that affect the ST risk are a possible misalignment of the

*Corresponding author

✉ G. Závodszy@uva.nl (G. Závodszy)

ORCID(s): 0000-0002-5235-9109 (C.J. Spieker); 0000-0001-7244-889X (N. Korin); 0000-0001-9522-6261 (P.H. Mangin); 0000-0002-3955-2449 (A.G. Hoekstra); 0000-0003-0150-0229 (G. Závodszy)

¹C.J.S. and A.Y.K. contributed equally to this work.

stent, in the form of stent malapposition or scaffold dismantling for BVS, and the design of the stent [63, 28, 17]. Stent designs differ widely in form, composition and geometrical structure. Common structures include single- or multi-layered metal alloy wires that are braided, knitted or welded into a cylindrical shape. In addition to single-layered carotid stents, a new generation of dual-layered stents have been introduced, with the anticipated benefit of reducing plaque prolapse through the stent struts and post-procedural embolism by adding an inner layer strut mesh with smaller free cell areas [44, 32]. While this seems to be effective in preventing plaque prolapse [13, 7], a small-scale study by Yilmaz *et al.* indicates that stents with a dual-layer design have a higher occurrence of acute vessel occlusion in comparison to stents with a single-layer structure when applied in emergent CAS [70]. Additionally, recent work by Sykora *et al.* is reporting the restenosis rate for patients treated with dual-layer carotid stents to be significantly higher in comparison to single-layer stents [59]. Overall, the introduction of dual-layer stents in CAS is recent and their ST risk compared to single-layer stents is unclear.

ST thrombi are a heterogeneous composition of platelets, fibrin, red blood cells (RBCs) and white blood cells [42]. Though the composition can differ depending on the stented vessel, the type of stent used and patient-specific immune response, the largest fraction of the thrombi is made up of platelets and fibrin [42, 52, 49]. Initial clot formation thrombosis is set off by the rapid aggregation of platelets in high shear environments and the reinforcement of the clot through fibrin formation. This initial aggregation is commonly mediated via entanglement with von Willebrand factor (VWF) molecules and fibrinogen which are present in ST thrombi as well [42, 37, 31].

Computational simulations have found a broad utilization in studying stent design [18, 27] and deployment [20] as well as related pathologies, such as in-stent restenosis [14, 6, 74] and ST [8, 9]. Jiménez *et al.* presented a purely continuous flow-based stent strut design study, discussing the effects of strut embedment depth and shape on recirculation regions proximal and distal to the strut in regards to flow direction [27]. In a more recent work, Chesnutt *et al.* are considering cellular flow to investigate the initiation of ST in coronary artery stenting. The mesoscale model utilizes the discrete element method to simulate platelet interactions, including their activation state, around misaligned struts [8, 9].

The current work investigates two clinically used carotid stents – a single-layer and a dual-layer one – to assess the effect of their design differences on cellular flow behaviour that is potentially related to ST by evaluating a complementing *in vitro* and *in silico* setup. The former introduces a novel macrofluidic carotid artery flow chamber [30] to perform aggregation intensity measurements on adhesive surface coatings. The complementing simulations are setup in a multiscale framework to enable capturing the size of the whole stent, while also allowing to infer cellular behaviour around the stent struts. Macroscale continuum flow

simulations of entire stented carotid vessel segments are performed to compute the bulk flow behaviour. Information from the bulk flow is then used as a boundary condition for the microscale cellular simulations around the strut segments of the two carotid stent designs. To the best of the authors' knowledge, no cellular-level study has investigated the difference between single-layer and dual-layer carotid stent designs.

The simulations of both stented segments display a reduced platelet availability in vicinity to the vessel wall when compared to a non-stented reference setup. The same trend is reflected in the *in vitro* experiments. When comparing the single- to the dual-layer design, the simulations further show, that the introduction of an inner strut layer in the dual-layer design elevates local shear rate and rate of elongation magnitude on top of the inner layer struts, while also decreasing the wall shear rate. Additionally, a change in local platelet distribution can be observed in the vicinity of the wall, in conjunction with larger stagnation zones and reduced recirculation regions around the outer layer struts of the dual-layer design. The cell resolved simulations reveal the significant influence that the recirculation regions around the stent struts have on local cell distributions. These factors might play an important role in the future development of stent designs aiming to reduce ST: optimizing the shape of the recirculation regions by small adjustments to the strut arrangement could significantly influence the local platelet availability and with it the risk for ST.

2. Materials and Methods

The effects of carotid stent design on cellular flow behaviour are assessed via *in vitro* platelet surface coverage experiments and by evaluating differences in local flow profiles and cell distributions observed through blood flow simulations. The experiments are performed in a novel carotid artery chamber, where the stented segment is coated with either a human carotid atherosclerotic plaque homogenate (HAP) or collagen. The simulations are setup in a multiscale framework, where continuum fluid simulations of the entire stented geometry are performed to capture properties of the bulk flow in the whole extent of the stent. Bulk flow behaviour information is used to extract boundary conditions for microscale cell-resolved simulations, which are deployed around the strut segments of the two carotid stent designs.

In the experimental work, two commercially available carotid stent designs, namely Carotid Wallstent (Boston Scientific, Natick, Massachusetts, USA) and Casper RX (MicroVention/ Terumo, Aliso Viejo, California, USA), are compared to each other, as well as to a *reference* case without a stent. Wallstent is a single-layer mesh stent, consisting of overlaying cobalt – chromium alloy struts, creating around 1.09 mm^2 large rhomboid-shaped free cell areas when the stent is open. Casper is a dual-layer nickel – titanium alloy mesh with approximately 6.1 mm^2 large outer layer free cell areas containing $16 \times 0.38 \text{ mm}^2$ large inner free cell areas

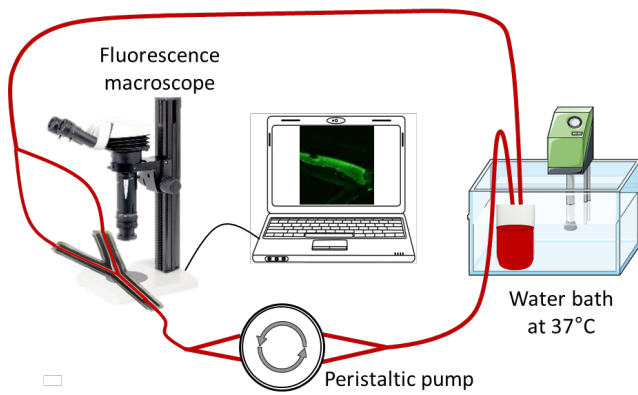


Figure 1: Schematic of the *in vitro* experimental setup, including circulation of blood through the carotid chamber, a water bath and a peristaltic pump. The elastomer carotid chamber is placed under a fluorescence microscope linked to a computer to capture images of the platelet surface coverage.

each, in the open state. Both stent types are deployed in carotid stenting procedures.

In the interest of conciseness the stent designs are subsequently referred to as *single-layer* and *dual-layer* stent design for both experiments and simulations.

2.1. *In vitro* experimental setup

The macrofluidic perfusion system is a closed circular model consisting of a peristaltic pump (Watson-Marlow, La-Queue-Les-Yvelines, France), a water bath and an elastomer chamber placed under a fluorescence microscope linked to a computer (see Fig. 1) [30]. The silicone elastomer chamber reproduces the average dimensions of the human carotid artery, with a diameter of 6 mm for the common carotid artery [35]. The carotid chambers are coated with either Horm-type collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or HAP (16.5 mg/mL of proteins wet weight) and either stent type, *single-layer* Wallstent or *dual-layer* Casper, is inserted subsequently. Additional experiments are performed without inserting the stent, to function as a *reference* case. Perfusion is performed at a flow rate of 380 mL/min, the human reference of carotid blood flow [3]. During blood perfusion, images are taken every 15 seconds automatically with Las X (Leica) to quantify platelet aggregation over time. Images are also taken after cleaning the chamber with PBS and quantify platelet aggregation at the end-point.

Blood donation

The study is conform to the ethical standards of the Declaration of Helsinki. All blood donors gave their free and informed written consent to participate and were healthy volunteers. Blood (45 mL) is collected in a tube containing hirudin (5 mL, final concentration: 100 U/mL) (Transgene, Illkirch-Graffenstaden, France) and kept at 37°C. The first couple mL of blood are discarded. Legal and ethical authorization for the use of collected blood for research was obtained through a national convention between the French

National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675).

Macrofluidic flow chamber mimicking the carotid artery

The dimensions of the carotid flow chamber are based on the well-known average dimensions of the lumen of human carotid (common, internal and external carotids). The fabrication of the chamber has been described previously [30].

Flow experiments in the macrofluidic flow chamber

The chamber is passivated with 3 mL of 1% HSA (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 30 minutes at room temperature. Chambers are rinsed with PBS supplemented with CaCl_2 (2 mmol/L) and MgCl_2 (1 mmol/L) (ThermoFisher Scientific Illkirch-Graffenstaden, France; Sigma-Aldrich, Lyon, France). A Casper stent or a Wallstent is placed into the chamber using a catheter as in clinics. The flow system is composed of tubing, connectors, the peristaltic pump, the chamber and a water bath as described previously by Kern *et al.* [30]. The system is primed with 1X PBS at a flow rate of 380 mL/min (mean average flow rate in human carotid [3]) to remove air bubbles and check for the absence of leaks. Human whole blood collected on hirudin (100 U/mL) and incubated with DiOC₆ (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (Molecular Probes, Paisley, United Kingdom) to label platelets, is then perfused for 10 minutes through the flow chamber. Real-time visualization of platelet adhesion and thrombus formation is performed with a fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

Quantification of platelet aggregates

The images were analysed to quantify the fluorescent surface that corresponds to the platelet aggregates. The edges of the flow chamber are identified manually on the images and a measurement is made to obtain the whole area. A threshold is then set to cover the platelet aggregates formed to determine the surface attachment area of the aggregates. The ratio of the fluorescent area to the total area is used to quantify and compare the platelet aggregation under different conditions.

Human atherosclerotic plaque homogenate preparation

Carotid human atherosclerotic plaques are recovered from the department of vascular surgery of the Hospital of Strasbourg. Plaques are cryo-grinded with liquid nitrogen and a mortar to obtain a fine powder. Powder is put in a 15 mL Falcon tube and PBS (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) is added at a rate of 4 mL per gram of powder. The mixture is homogenised by gently stirring the tube and then undergoes 20 cycles of sonication (Bioblock Vibra cell 75115, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) at an amplitude of 30%, each cycle lasting 15 seconds alternating with 10 seconds of rest to avoid overheating the system. Homogenisation of the mixture is carried out at

intervals of 5 cycles. As this process can generate heat, the 15 mL Falcon tube is placed in a 50 mL Falcon tube filled with ice and water. The resulting homogenate is centrifuged at 2240 G for 10 minutes at a temperature of 4°C. The layer of interest is removed, weighed and resuspended at 16.5 mg protein/mL wet weight in PBS [29]. Five different plaques are mixed to obtain an homogenate to use for coating.

Statistics

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses are performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). Statistical significance between different groups was assessed by the one-way ANOVA test or the Kruskal-Wallis test, according if they follow a Gaussian law or not, respectively. The $p < 0.05$ values are considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.2. Multiscale simulation setup

The simulations are setup in a one-way coupled multiscale framework. Macroscale continuum fluid simulations are setup to supply bulk flow information as a velocity boundary condition to microscale cell-resolved simulations. The geometrical constraints are informed by literature and the experimental setup [69, 39]. The multiscale setup is visualized in Fig. 2.

Continuum fluid simulation setup

Initially, macroscale simulations of a stented carotid artery segment are performed using the finite element method-based commercial computational fluid dynamics (CFD) software COMSOL Multiphysics 6.1 (COMSOL AB). To prepare the geometry for COMSOL, the open stents are rebuilt in the computer-aided design (CAD) software Autodesk Fusion 360 (version 2.0.17457, Autodesk Inc.) based on dimensions from the manufacturers and literature. The open *single-layer* and *dual-layer* stents have a diameter of 8 mm each and a length of 29 and 30 mm, respectively. The large struts of the *single-layer* stent are 195 μm in diameter opposed to 180 μm for the *dual-layer* design. Since the focus is on the difference between *single-* and *dual-layer* designs, the larger struts are set to the same diameter of 180 μm . This reduces the original strut diameter of the *single-layer* design by 7.7%, which is expected to have a negligible effect. The smaller inner layer stent struts of the *dual-layer* design have a diameter of 42 μm . The radial strut distance and helix pitch of the individual struts are set to match the respective strut free cell areas and the angles between overlaying struts of the fully open stents [69, 39]. Consequently, the open *single-layer* stent CAD geometry consists of 20 individual struts - 10 left-handed and 10 right-handed - arranged at a 36° radial strut distance with a 9.67 mm large helix pitch. The *dual-layer* stent contains 6 large outer layer and 18 inner layer struts in each rotation direction with a 15 mm large helix pitch each and arranged at 60 and 15° radial strut distance, respectively. Finally, the CAD geometry of the *dual-layer* design is modified to avoid highly skewed mesh elements at the tangential edge interface of the two strut layers [34, 33].

To achieve this, every fourth inner layer strut of the *dual-layer* stent geometry, set to match the 60° radial interval of the outer layer struts, is omitted. For the same reason, all remaining inner layer struts are embedded into the outer layer struts by 1/4 of the inner strut diameter. Furthermore, the braided nature of the struts is neglected in the CAD models of both stent designs and instead struts within the same layer are fully intersecting.

In alignment with the *in vitro* experiments, the simulated carotid artery segment is set to a diameter of 6 mm. Since the diameter is smaller than the open stent diameter, the stent is restricted from full expansion during deployment. To compensate for this partial compression, the stent remains elongated compared to the fully open state, which changes the stent strut alignment and subsequently the shape and area of the stent strut free cells. To account for this change in the simulation, the CAD models are adjusted for implanted stent dimensions by decreasing the stent diameter and increasing the stent length accordingly, while maintaining the radial strut distance and adjusting the helix pitch to preserve the revolution count of the struts (see Fig. 2 A and B). The main experimental and simulation dimensions are summarized in Table 1.

The compression of the stent is exerted as a radial force of the stent struts on the vessel wall, which causes the elastic carotid artery wall to stretch and be displaced at the location of stent struts [61]. This resulting embedment of the stent into the vessel wall is also present in RT601 silicon elastomer channels, as used in the *in vitro* experiments, albeit to a lesser degree. To account for the embedment effect in the simulations, the diameter of the compressed strut helices is chosen to be half a strut diameter larger than the vessel diameter, leading to a strut embedment of 1/4 strut diameter into the vessel wall.

The vessel surrounding the stent is simplified as a straight cylinder geometry. In addition to the *single-* and *dual-layer* stent model, a *reference* geometry without a stent, consisting of only the vessel cylinder, is set up. To account for the non-Newtonian fluid property of whole blood, the Carreau model is utilized. The model parameters for whole blood are adopted from Tabakova *et al.* [60]. In accordance with experimental values for whole blood, the fluid density is set to 1060 kg/m³ [22] and the flow rate is set to 380 mL/min, matching the flow rate of the *in vitro* experiments.

For each setup - non-stented *reference*, *single-layer* and *dual-layer* stent - a stationary result is computed in COMSOL. Pulsatility is not considered in these simulations, since they are only used to retrieve an average velocity value. Following the completed simulations, the average radial 1D velocity profiles are calculated to extract the average velocity 250 μm from the vessel wall, at radius 2.75 mm. The resulting velocity value is supplied to the microscale cellular simulations as a velocity boundary condition.

Cell-resolved simulation setup

To perform microscale blood flow simulations in the vicinity of the stent struts at the vessel wall, the cell-resolved

Table 1

Stent and stented vessel dimensions for experiments and macroscale simulations. Experimental dimensions of the *single-layer* and *dual-layer* stent design refer to Wallstent and Casper stent dimensions, respectively. The experimental parameters: stent diameter, stent length, free cell area and strut angle refer to the open state of the stents. Multiple values for *dual-layer* stent dimensions refer to the outer and inner layer struts of the stent, respectively.

Stent design	Experimental dimensions							Simulation dimensions		
	Stent diameter (mm)	Stent length (mm)	Strut diameter (μm)	Free cell area (mm^2)	Angle ($^\circ$)	Vessel diameter (mm)	Implanted length (mm)	Stent diameter (mm)	Radial strut distance ($^\circ$)	Helix pitch (μm)
Single-layer	8	29	195	1.09	130-140	6	48	6	36	16
Dual-layer	8	30	180, 42	6.1, 0.38	105-115	6	45	6	60, 15	22.5

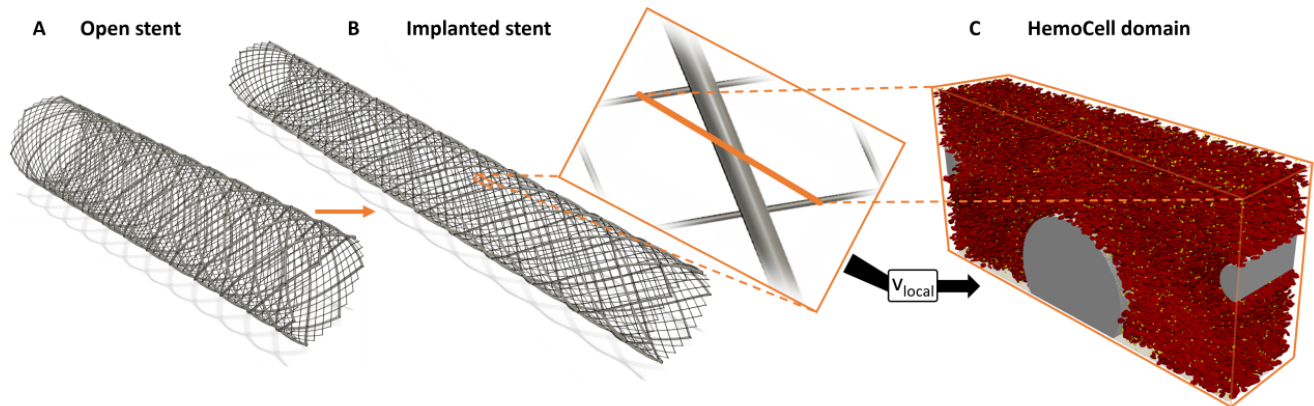


Figure 2: One-way coupled multiscale simulation setup visualized by using the *dual-layer* stent case as an example. (A): fully open stent geometry at 8 mm diameter. (B): Implanted stent geometry at 6 mm diameter with inset to visualize the selected region for the idealized microscale simulations. (C): Visualization of microscale simulation in HemoCell at final time step $t = 1$ s, driven by velocity boundary condition extracted from continuum fluid COMSOL simulation.

HemoCell framework is used [41]. HemoCell is based on the lattice Boltzmann method as a fluid solver coupled to the discrete element method membrane solver via the immersed boundary method. The open-source framework has been thoroughly validated in the past and has found a wide array of application, from studying fundamental cellular margination behaviour to actively modeling the platelet aggregation process [72, 73, 11, 50, 51, 56, 57, 55, 71].

The simulation geometry of each respective case, *reference*, *single-layer* and *dual-layer* stent, is setup to mimic a small region of the stented carotid artery segment, focused on the vicinity to the vessel wall. Each geometry consists of a $500 \times 100 \times 250 \mu\text{m}^3$ ($X \times Y \times Z$) large cuboid. The *single-layer* case geometry includes a single strut at half the cuboid length and the *dual-layer* case geometry contains a second, inner layer, strut that is split between the in- and outlet Y - Z planes of the geometry (see Fig. 3). The strut dimensions and their embedment into the vessel wall is identical to the continuum fluid simulations (see Table 1). The flow is driven by a velocity boundary condition assigned to the X - Y top plane wall in positive X -direction, which establishes the flow profile in the local region of a stented carotid artery segment.

Furthermore, periodic boundary conditions are utilized in the X - and Y -dimensions. The periodic boundary condition in X -dimension directs the flow to continuously bypass the stent struts, while the simulated geometry stays limited to only a single strut set (see Fig. 3), consequently reducing computational cost. To create planar symmetry at the in- and outlet Y - Z planes, which is necessary for the periodic boundary conditions to function correctly, the angled strut orientations are omitted and struts are instead aligned perpendicular to the flow direction. The velocity values for the velocity boundary condition are prescribed based on the continuum fluid simulations (see Fig. 2 B and C).

Each case is initialized with a local hematocrit of 25% and a platelet volume concentration of 1.7% with cells placed at random positions and orientations [72]. For the *reference*, *single-layer* and *dual-layer* case this corresponds to 34,935 RBCs and 18,857 platelets, 34,673 RBCs and 18,908 platelets and 34,646 RBCs and 18,884 platelets, respectively. Individual RBCs and platelets have a volume of $90 \mu\text{m}^3$ and $11 \mu\text{m}^3$ each. The platelet concentration is significantly larger than physiological levels to increase statistical significance [38]. At 1.7% the increased platelet

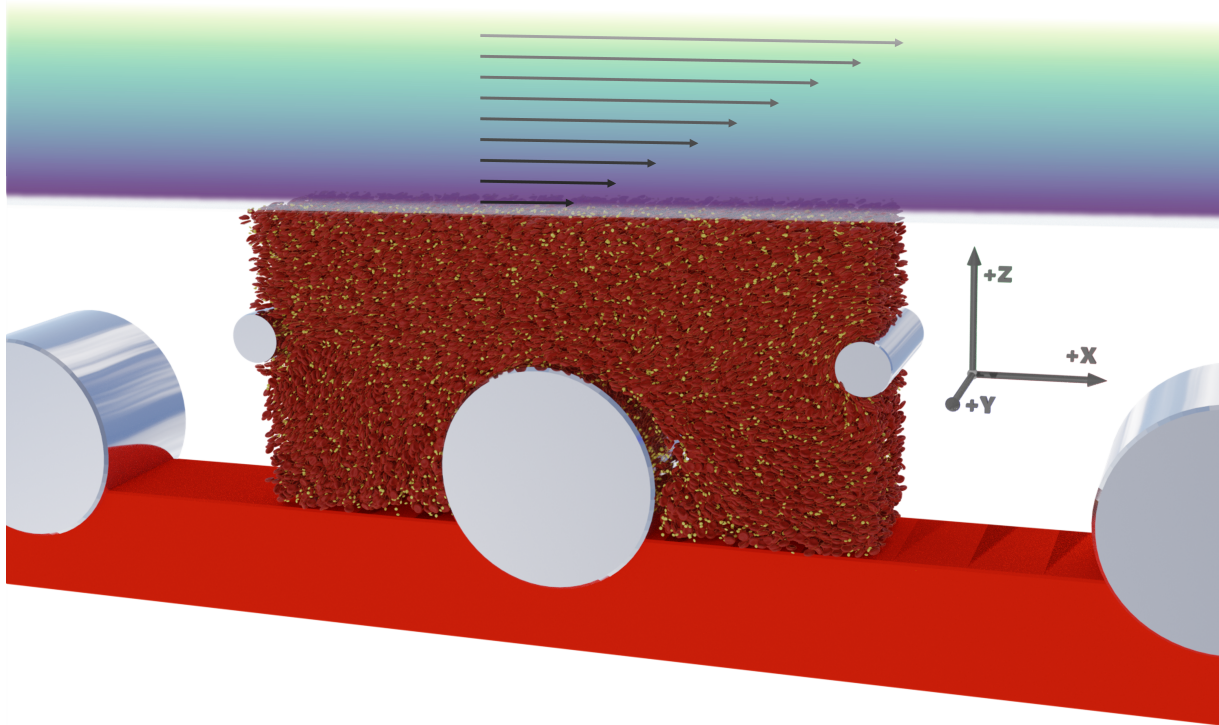


Figure 3: Visualization of *dual-layer* case simulation in HemoCell with the strut locations in grey metallic appearance and the bottom wall colored in red. The simulated domain is limited to the cuboid volume that contains the cells, though the periodic boundary condition in X-dimension directs the flow to continuously bypass the stent struts. The RBCs and platelets within the cuboid volume are colored in dark red and yellow, respectively. The shear profile decreasing towards the X-Y top plane of the simulated domain represents the shear gradient from the macroscopic simulation. The velocity boundary condition of the HemoCell simulation is based on the local velocity evaluation of the COMSOL simulation.

volume concentration is still negligible, therefore the flow dynamics remain fully governed by RBCs.

With the respective velocity boundary supplied by the macroscale continuum fluid simulations, each of the three HemoCell simulations is executed on 50 nodes (6,400 cores) on the ARCHER2 UK national supercomputer (EPCC, Edinburgh, United Kingdom) for approximately 72 h of wall time to reach 1 s of simulated flow.

Subsequently, the flow profiles and cellular distributions of the simulation output are evaluated. Shear rate and rate of elongation profiles (see Spieker *et al.* [56, 57, 55]) are displayed as side views (X-Z plane) of the geometry. The profiles are averaged across the Y-axis and over time for iterations between 0.9 - 1 s. Cellular distributions are visualized from the same viewpoint, displaying average local RBC and platelet volume concentration at lattice node resolution on the X-Z plane ($0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$) and across the entire Y-axis (100 μm). Additionally, platelet concentration in 4 μm vicinity to the vessel wall is quantified in a 1D distribution plot across the X-axis by reducing bins in Z-direction to a single instance ranging from 0 - 4 μm . In this case, cellular distributions are time averaged between 0.5 - 1 s.

3. Results

3.1. *In vitro* results

Stent implantation reduces thrombus formation on both collagen and human atherosclerotic plaque homogenates. The two braided *single-* and *dual-layer* stents are studied and compared to a non-stented *reference* case. In a chamber coated with type-I fibrillar collagen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a clear signal accumulating over time is observed, which is explained by the formation and the accumulation of platelet aggregates (see Fig. 4 A). Unexpectedly, when blood is perfused through the collagen-coated chamber implanted with the *single-* or *dual-layer* stent, epifluorescence images indicate a decreased fluorescent signal for both cases (see Fig. 4 A). This observation is confirmed by a quantification, indicating a reduction of 68% and 48% respectively of the size of platelet aggregates as compared to the control with no stent implantation (*reference* collagen: $32.2 \pm 5.6\%$; *single-layer* stent: $10.4 \pm 3.5\%$; *dual-layer* stent: $16.7 \pm 4.1\%$; $p = 0.0151$) (see Fig. 4 B). This result suggests that a stent can exhibit an antithrombotic effect by reducing platelet accumulation in a diseased vessel.

To extend this result, similar experiments in which collagen is replaced by human atherosclerotic plaque (HAP) homogenates are performed to better mimic the presence of atherosclerotic plaque exposing a thrombotic surface. A

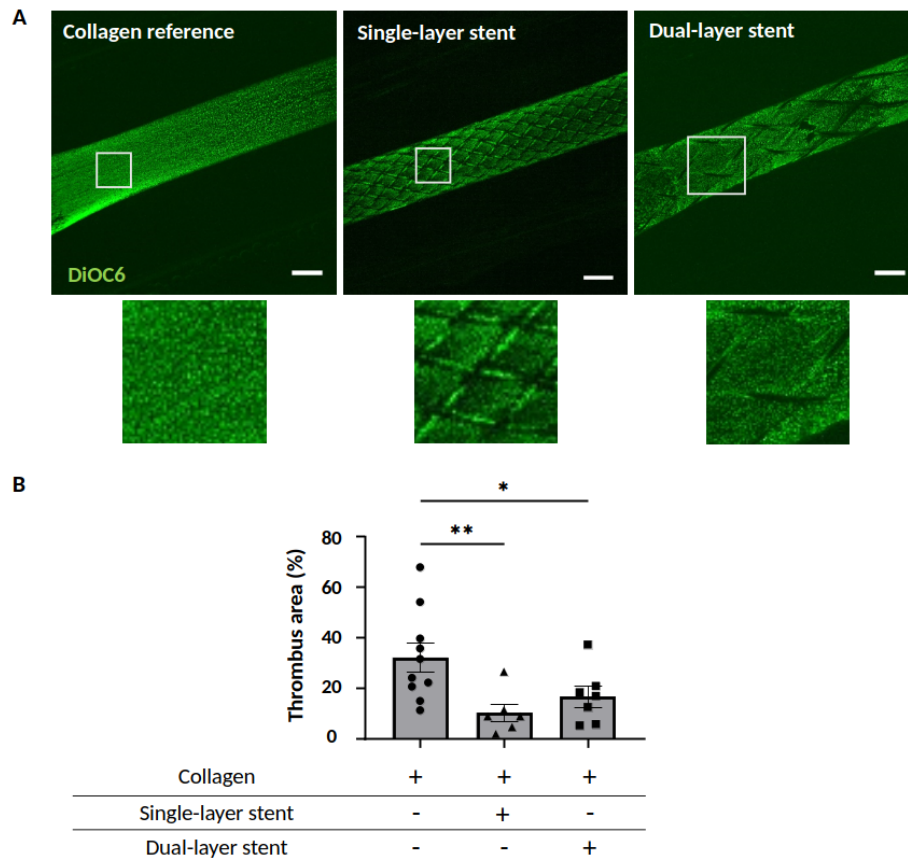


Figure 4: Images of platelet aggregates on stents and collagen. (A) Platelet aggregation on collagen in the *reference* chamber (no stent) (left), in a chamber implanted with a *single-layer* (middle) and a *dual-layer* (right) carotid stent, after 10 minutes perfusion of anticoagulated whole blood labelled with DiOC₆. Scale bar: 2 mm. (B) Surface area quantification of platelet aggregation in the *reference* chamber coated only with collagen, or implanted with a *single-* or *dual-layer* stent (* $p = 0.0366$; ** $p = 0.0068$). Values are the mean \pm standard error of the mean.

reduction of platelet accumulation on the coated surface is observed in the *single-* or *dual-layer* stent cases when compared to a non-stented *reference* chamber (see Fig. 5 A). This result is confirmed by a quantification showing a 28% and 41% reduction in thrombus area for the *single-* and *dual-layer* stents respectively when compared to *reference* chamber coated with HAP, even though statistical significance was only reached with the *single-layer* stent (*reference* HAP: $35.3 \pm 3.7\%$; *single-layer* stent: $25.5 \pm 3.5\%$; *dual-layer* stent: $21 \pm 5.4\%$; $p = 0.0595$) (see Fig. 5 B). In summary, the results indicate that the presence of a stent, regardless of its geometry, reduces thrombus formation in a chamber coated with thrombogenic material. Except for qualitative differences in aggregate coverage distribution, the two stent designs exhibit no significant difference in total aggregate size.

3.2. *In silico* results

The continuum fluid simulations of the entire vessel segment reveal the influence of the implanted stents on the local flow profiles in vicinity to the wall. While the three setups - non-stented *reference*, *single-layer* and *dual-layer* stent - are configured with the same flow rate, they display

a different average local velocity $250 \mu\text{m}$ from the wall of 72.7 mm/s , 59.4 mm/s and 43.9 mm/s , respectively. The standard deviations are insignificant (see average 1D radial flow profiles in Fig. 13).

The different local velocities are subsequently applied as velocity boundary conditions in the configurations of the cellular flow simulations. The respective boundaries are located at the same distance of $250 \mu\text{m}$ from the wall and drive the simulation of each case to reach 1 s of simulated flow (see Movies 16 to 18). Following the completion of the simulations, the local flow dynamics and cellular distributions are analyzed and compared.

Figure 6 A and B shows the shear rate profile for the *single-* and *dual-layer* stent case, respectively. Both cases display the highest shear rate magnitude at the topmost point of the innermost strut, at a Z-axis height of $135 \mu\text{m}$ for the large strut and $166.5 \mu\text{m}$ for the small inner layer strut. Peak shear rate values reach 1810 s^{-1} for the *single-layer* case and 2236 s^{-1} for the *dual-layer* case. The peak rate of elongation values of 490 s^{-1} and 721 s^{-1} for the *single-* and *dual-layer* case respectively, are located slightly below the topmost strut point towards the proximal and distal side (see Fig. 7).

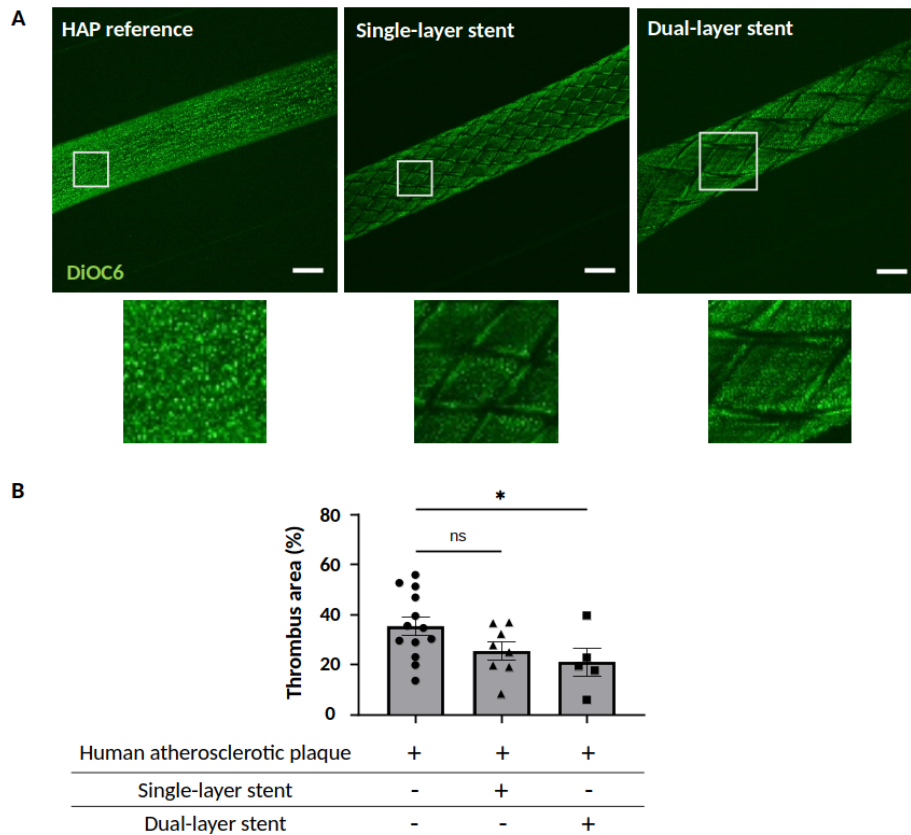


Figure 5: Images of platelet aggregates on stents and human atherosclerotic plaque (HAP). (A) Platelet aggregation on HAP in the *reference* chamber (no stent) (left), in a chamber implanted with a *single-layer* (middle) and a *dual-layer* (right) carotid stent, after 10 minutes perfusion of anticoagulated whole blood labelled with DiOC₆. Scale bar: 2 mm. (B) Surface area quantification of platelet aggregation in the *reference* chamber coated only with HAP, or implanted with a *single-* or *dual-layer* stent (**p* = 0.0337; ns *p* = 0.0833). Values are the mean \pm standard error of the mean.

Although the set surface velocity in the *dual-layer* case is 26% lower than in the *single-layer* case, the addition of the inner layer strut increases the peak shear rate by 24% and rate of elongation by 47%. In comparison, the *reference* case experiences a maximum shear rate of 545 s⁻¹ and peak rate of elongation values of 113 s⁻¹ at a faster flow velocity. The peak shear rate represents the wall shear rate at a Z-axis height of 0 μ m. The existence of elongational flows in the non-stented channel altogether can be contributed to sites of cell - cell interactions, since on the macroscale that flow is comprised of pure shear.

The velocity profiles of the *single-* and *dual-layer* case are visualized in the form of streamlines superimposed on a side-view visualization of the simulations in Figs. 8 and 9, respectively. The *single-layer* case displays a higher flow velocity throughout the channel, due to the higher velocity computed from the whole-stent macroscale simulations. Additionally, the inner layer of the *dual-layer* design forces the velocity gradient towards the top plane of the domain, which correlates with the elevated shear and elongational flow depicted in Figs. 6 (B) and 7 (B). The *single-layer* case exhibits significant recirculation regions spanning across the bottom plane of the channel, proximal and distal from the stent strut location. The flow separation occurs on the distal

side of the stent strut at an approximate Z-axis height of 85 μ m, while the reattachment on the proximal strut side is situated slightly lower at about 75 μ m. Additionally, small stagnation zones appear at the bottom plane of the domain, ranging approximately 20 μ m in negative and positive X-direction from the proximal and distal strut intersection points, respectively.

The *dual-layer* design displays smaller separated flow regions, occurring around 75 μ m before and after the large stent strut intersection on the X-axis and at a Z-axis height of approximately 70 μ m on both sides of the large strut. These regions are not fully recirculating and can be considered stagnation zones, due to the very low local velocities (below 0.0001 mm/s). Naturally, the *reference* case does not display recirculation regions or stagnation zones.

Observation of the underlying side-view visualisations suggests a correlation between the location and size of the separated flow regions and the cellular distributions: the flow separation points align with volumes of low RBC concentration and platelet accumulation in both the *single-* and *dual-layer* design. These volumes are well visible in Figs. 8 and 9 in white color. The largest volume appears at the distal flow separation point of the large strut for both cases.

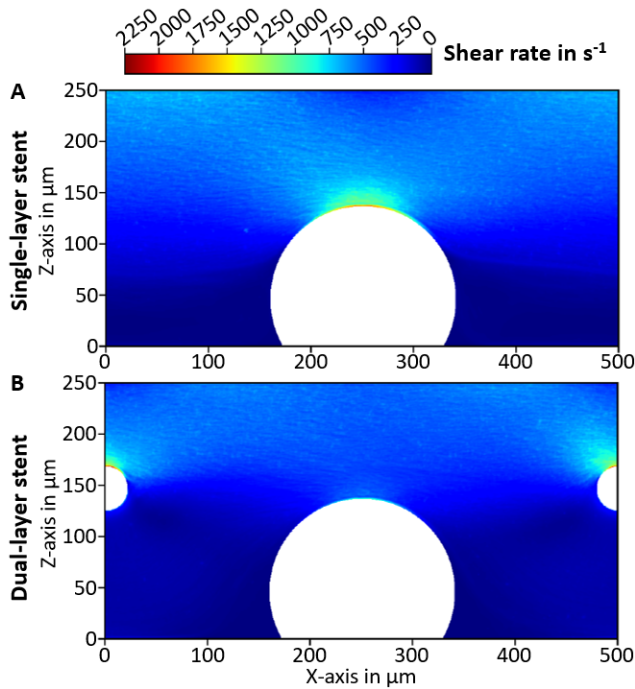


Figure 6: Average shear rate profile in cell-resolved simulation for (A) *single-layer* and (B) *dual-layer* case with flow in positive X-direction. Results are averaged across the Y-axis and over multiple time steps.

To confirm and quantify differences in cellular distribution, the average cell volume concentrations are evaluated in Fig. 10. The *reference* case displays almost homogeneous hematocrit and platelet volume concentration distribution, matching the initialized concentrations of 25% and 1.7%, respectively (see Fig. 10 A and D). Deviations can be seen in the volume layer close to the vessel wall: a reduced hematocrit concentration and an increased platelet volume concentration at the vessel wall are physiologically expected due to the shear-induced formation of a cell free layer and subsequent margination of platelets into this layer [1, 73].

The previously observed recirculation regions in the *single-layer* case are reflected in the layered cell distributions (see Fig. 10 B and E). The flow separation interface creates a layer of reduced hematocrit concentration, which is largest at the distal stent strut separation point. The same area exhibits increased platelet concentration. The stagnation zones at the proximal and distal strut intersection with the bottom plane also display low RBC concentration and increased platelet concentration.

The *dual-layer* design (see Fig. 10 C and F) shows the absence of recirculation regions. The previously observed stagnation zones contain accumulations of RBCs and platelets in comparison to the surrounding concentrations. Their classification as stagnation zones is further substantiated by the comparatively low flow velocity, that also leads to lower standard deviation in cell concentration (see Fig. 14 C and F). The similar regions of reduced RBC concentration and increased platelet concentration as observed

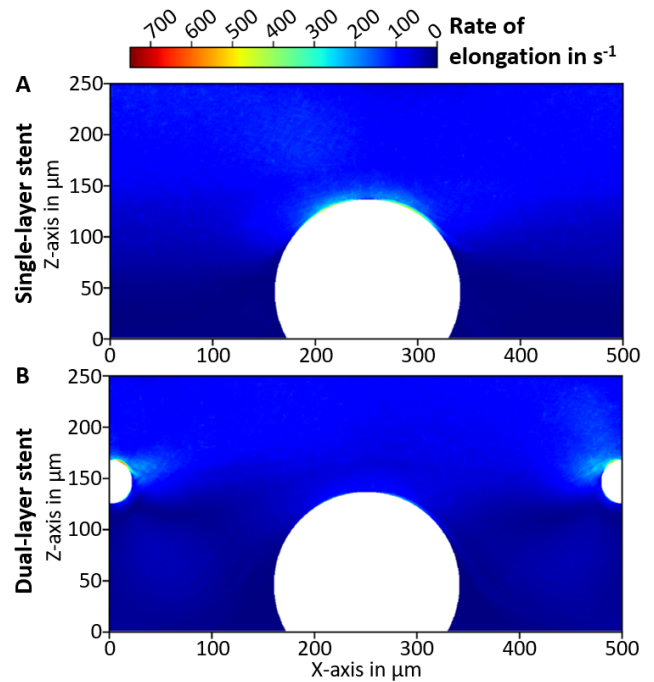


Figure 7: Average rate of elongation profile in cell-resolved simulation for (A) *single-layer* and (B) *dual-layer* case with flow in positive X-direction. The velocity results are averaged across the Y-axis and over multiple time steps.

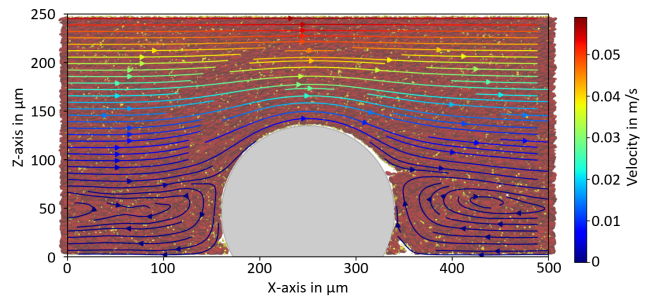


Figure 8: Streamlines colored by average velocity superimposed on side-view visualization of the *single-layer* stent case. The velocity results are averaged across the Y-axis and over multiple time steps and the cell positions are captured at the final time step $t = 1$ s. The visible RBCs and platelets are colored in dark red and yellow, respectively.

in the *single-layer* case can be seen at the flow separation interface of the *dual-layer* case. The inner layer strut exhibits an increase in platelet concentration on the distal side and a layer of reduced RBC concentration spanning across the domain in X-direction.

To display platelet availability at the vessel wall where initial adhesion and aggregation commonly occurs [31], the platelet concentration in $4 \mu\text{m}$ distance to the wall is evaluated along the X-axis of the domains (see Fig. 11). These are the platelets assumed to be available for binding at the wall. In alignment with previous results, the *reference* case displays an even distribution at around 1%. Both stent cases show highly uneven platelet availability across the

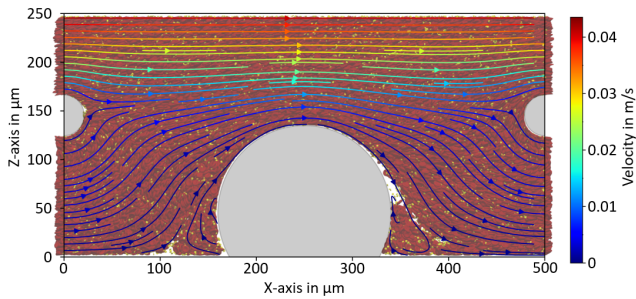


Figure 9: Streamlines colored by average velocity superimposed on side-view visualization of the *dual-layer* stent case. The velocity results are averaged across the Y-axis and over multiple time steps and the cell positions are captured at the final time step $t = 1$ s. The visible RBCs and platelets are colored in dark red and yellow, respectively.

surface. While both designs display peak concentrations proximal and distal to the large strut location, the *dual-layer* case exhibits increased platelet concentration below the inner layer strut, when compared to the *single-layer* case. The concentration peaks in the *dual-layer* design match the location of platelet accumulations in the stagnation zones, seen in Fig. 10 F. The distal concentration peak in the *single-layer* case is an accumulation point located within the stagnation zone, as well. The discontinuity in concentration before and after the accumulation points can be attributed to low local platelet occurrence that is represented as zero by the discrete data-saving steps of the evaluated time range.

Figure 12 A combines the total average platelet concentration within $4 \mu\text{m}$ distance to the vessel wall for each case. Both stented cases display lower platelet concentration than the *reference* case at 2.19%, with 0.86% for the *single-layer* and 0.96% for the *dual-layer* design. Note that these values are based on the total volume, irrespective of the volume exclusion of the stents. Considering fluid-only volume (see Fig. 12 B) leads to the concentrations of 1.26% and 1.41% for the *single-* and *dual-layer* case, respectively. The difference between both stented cases remains small, but significant when taking the standard deviation into account. The trend of the results qualitatively matches the experimental platelet surface coverage measurements in Figs. 4 and 5 B.

4. Discussion

In this study, a *single-layer* and a *dual-layer* carotid stent design were investigated by utilizing a novel macrofluidic carotid chamber for platelet surface coverage measurements and a multiscale simulation setup to study flow dynamics and cellular distributions in vicinity to the vessel wall.

The multiscale setup consists of macroscale continuum CFD simulations of the entire stented segment to accurately inform the local velocity boundaries for microscale cell-resolved simulations, capturing the dynamics around individual struts. The differences in local flow velocity revealed by the macroscale simulations and the heterogeneous cellular distributions discovered by the microscale simulations

substantiate the need for a multiscale simulation setup to study stent design in large vessels.

Both stent designs display a decreased platelet surface coverage in comparison to non-stented *reference* experiments (see Figs. 4 and 5). Two separate coatings were used: collagen coating (see Fig. 4), representing the exposure following endothelial damage, and HAP homogenate (see Fig. 5) to mimic the presence of atherosclerotic plaque. While HAP homogenate more closely resembles a ruptured plaque than fibrillar collagen coming from equine or bovine tendons, it has to be noted that the used plaque is crushed, thus the integrity of the collagen fibres and other proteins is likely impaired. Nonetheless, the experimentally observed reduction in platelet coverage of the vessel surface for both collagen and HAP covered surfaces could be the result of reduced near-wall platelet availability as found in the simulations. This is confirmed by evaluation of the cellular simulations: the trend in local platelet availability in close vicinity to the vessel wall (see Fig. 12) qualitatively matches the difference in experimental platelet coverage. It can be concluded, that the introduction of flow obstructions in the form of stent struts in a stented vessel segment reduces local platelet availability and subsequently the likelihood of aggregation to highly thrombogenic exposed collagen and HAP.

The simulations further reveal a significant difference in shear rate and rate of elongation between the *reference*, *single-layer* and *dual-layer* stent case (see Figs. 6 and 7). The latter, although driven by the lowest velocity boundary condition, exhibits the largest peaks in both shear rate ($> 2200 \text{ s}^{-1}$) and rate of elongation ($> 700 \text{ s}^{-1}$). The shear rate is well within the range where immobilized VWF can unfold and expose the A1 domain ($> 1000 \text{ s}^{-1}$), while it stays below pathologic levels associated with shear-induced platelet aggregation [53, 19, 37]. The rate of elongation on the other hand exceeds the critical range of $300 - 600 \text{ s}^{-1}$ defined by Sing *et al.* to be sufficient for the unfolding of plasma suspended VWF molecules [54]. Unfolded VWF molecules mediate the adhesion and aggregation of platelets, which is the initial facilitator of thrombus formation in arterial thrombosis [4, 31].

In alignment with previous findings by Jiménez *et al.*, large recirculation regions spanning the whole distance between neighbouring stent struts are demonstrated in the *single-layer* stent design [27]. In contrast to this, the *dual-layer* design is characterized by stagnation zones on the proximal and distal side of the large outer layer stent strut and the absence of recirculation regions. Flow stagnation is associated with blood coagulation and thrombosis, most commonly the formation of RBC rich clots in venous thrombosis. The increased RBC concentration within the stagnation zones of the *dual-layer* stent case therefore further heightens the likelihood of coagulation-driven clot formation [67, 15]. Additionally, the *dual-layer* design displays higher platelet concentration in close vicinity to the vessel wall compared to the *single-layer* design (see Fig. 12). This higher platelet availability translates to an increased

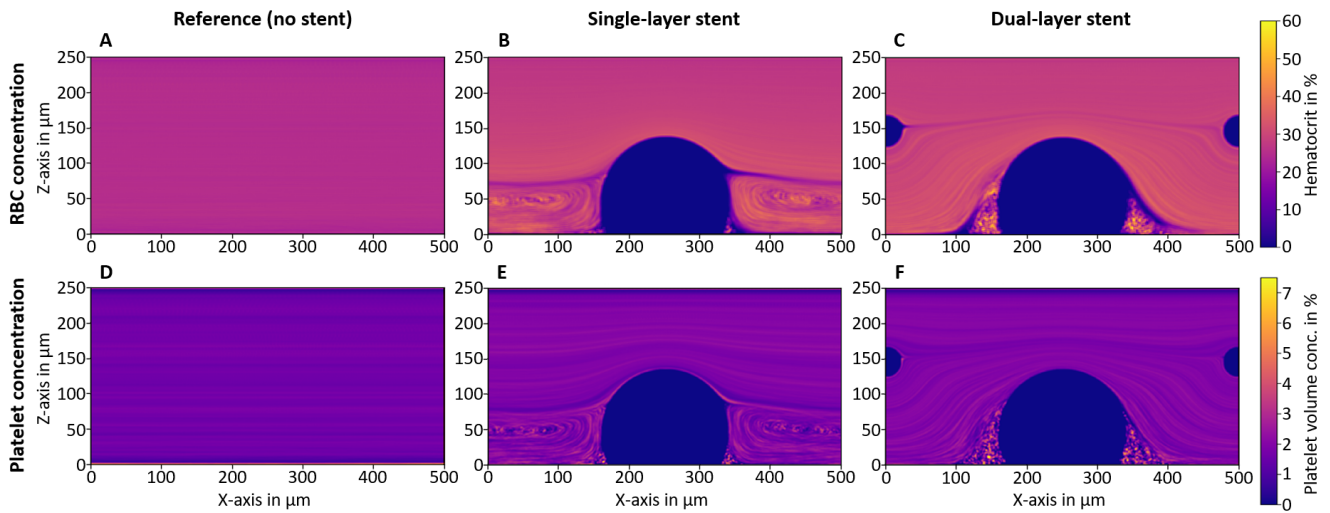


Figure 10: Average cell volume concentration across X- and Z-axis for the (A & D) *reference* (no stent), (B & E) *single-layer* and (C & F) *dual-layer* stent, respectively. RBC concentration in top row (A - C) and platelet concentration in bottom row (D - F). Results are averaged across the Y-axis and over multiple time steps. Flow is driven in positive X-direction.

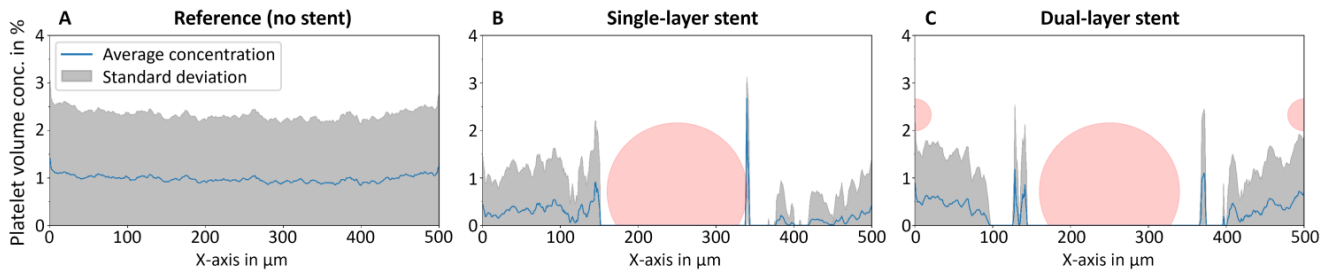


Figure 11: Platelet volume concentration within 4 μm distance to the vessel wall for the (A) *reference* (no stent), (B) *single-layer* and (C) *dual-layer* stent, respectively. The local volume concentration is time averaged between 0.5 - 1 s of simulated flow. Flow is driven in positive X-direction. As a visual indicator, the stent strut locations are marked in red in B and C. Note: the Y-axis represents platelet concentration and not spatial scale.

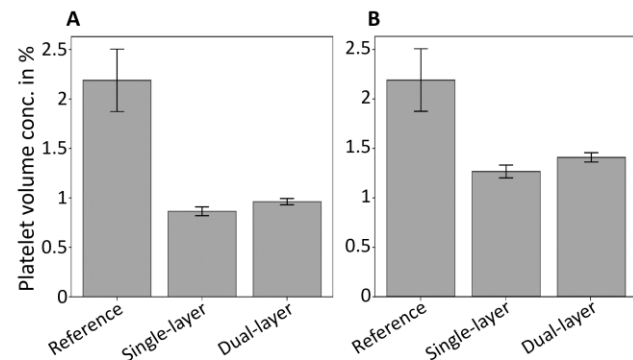


Figure 12: Total average platelet concentration within 4 μm distance to the vessel wall, Without (A) and with (B) normalizing for the fluid volume. Normalization excludes the empty volume of the large stent strut circular segment, between 0 and 4 μm from the wall. Results are time-averaged.

probability of contact between platelets and thrombogenic material and is associated with a higher risk for thrombotic

complications [21, 24]. To summarize, the presence of stagnation zones, heightened shear flow, including elongational flow, and increased platelet concentration are observed in the *dual-layer* design in comparison to the *single-layer* design. While not observed experimentally here, this confirms and gives a possible explanation for the results of recent studies by Yilmaz *et al.* and Sykora *et al.*, that *dual-layer* stents are potentially more thrombogenic than *single-layer* stents [70, 59]. The findings require further confirmation through simulations and experiments. Subsequent platelet surface coverage measurements in the presented carotid chamber with a less thrombogenic coating could reveal further trends for thrombus formation in the environment of a *dual-layer* stented carotid artery.

In general, the findings highlight that even minor differences in the local environment, introduced by the inner layer of the *dual-layer* stent, significantly influence factors that might be associated with ST, such as shear flow magnitude, flow stagnation zones, and platelet availability. Notably, the presence, shape and magnitude of the recirculation regions and stagnation zones, observable in cost-effective continuum flow simulations, substantially impact

the cellular distributions. These insights establish the potential to further optimize carotid stent design, as well as vascular stent design in general. The correlation between recirculation regions and cell distributions suggests that simple continuum CFD simulations can provide valuable knowledge about cellular distributions. Figure 15 confirms that the same streamline profiles resulting from the cellular simulations can be recreated by computationally less demanding CFD simulations. Additional simulations in the presented multiscale setup have to be deployed to quantify the described interdependence of recirculation regions and cellular distributions. A parametric study can subsequently assess strut shape, size and alignment as well as embedment depth to optimize the overall stent design towards creating physiological and therefore favourable flow magnitudes and cellular distributions.

Future work on the comparison between *single-layer* and *dual-layer* carotid stents includes assessing local differences in platelet coverage across the stent struts and free cell areas in more detail. Observations of the platelet thrombi surface on the fluorescent microscope images and simulated platelet concentration distributions show differences between the *single-* and *dual-layer* design, but additional experiments and simulations are required to quantify the emergent trend. Furthermore, the influence of different flow velocities, hematocrit concentrations and RBC stiffness on platelet coverage and availability, can be assessed in future experiments and simulations [73, 12].

To improve the accuracy of the simulations, a two-way coupling of the presented multiscale framework could be considered. The current simulation setup can be further improved by including pulsatility, vessel wall elasticity and stent strut braiding to more closely resemble *in vitro* as well as *in vivo* conditions. To further approximate the latter, patient-specific anomalies of diseased vessels, such as narrowing of the lumen or a stiffened vessel wall, can be included. Advancing the cellular simulation framework to actively model accurate platelet binding behaviour [55] could assist in studying ST risk in varying stent designs.

In summary, a comparison between a *single-layer* and a *dual-layer* stent intended for CAS in a combined *in vitro* and *in silico* setup is presented. The results indicate the presence of high elongational flows in combination with an increased platelet availability and local stagnation zones in the recently introduced *dual-layer* carotid stent design in comparison to the more established *single-layer* design. Additional experiments are required to validate the findings.

Furthermore, a significant influence of stent strut recirculation regions on local cell distributions is revealed by the simulations. This facilitates a novel approach to optimize stent design in general towards creating a favourable cellular flow environment around the stent struts.

Acknowledgements

C.J.S., A.G.H. and G.Z. acknowledge financial support by the European Union Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement No. 823712, the

CompBioMed2 Project. C.J.S., A.G.H. and G.Z. are funded by CompBioMed2. The use of supercomputer facilities in this work was sponsored by NWO Exacte Wetenschappen (Physical Sciences). The authors would like to thank Joey van der Kaaij, David de Kanter, and Robert Belleman for their contributions to the development of the visualization used in Fig. 3 and the animations displayed in Movies 16 to 18.

Supplementary material

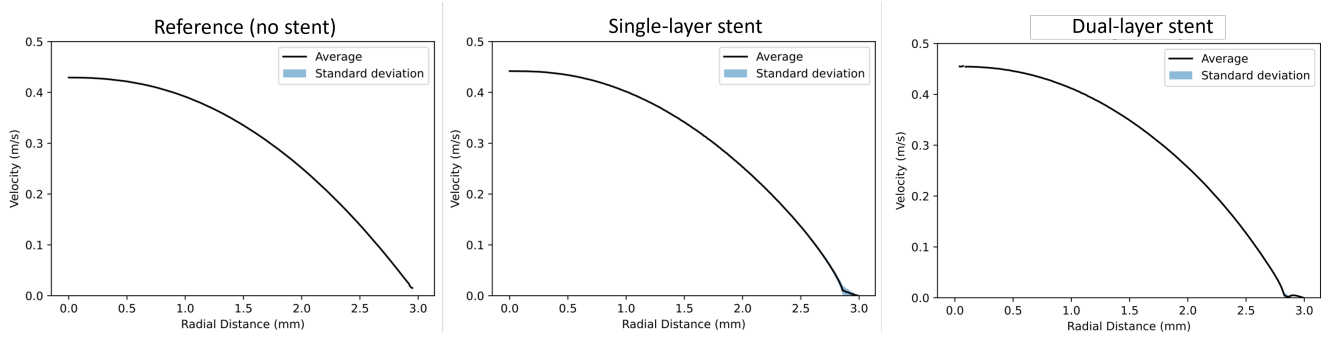


Figure 13: Macroscale COMSOL Multiphysics simulation results: Averaged 1D velocity profile in the *reference*, *single-layer* and *dual-layer* case.

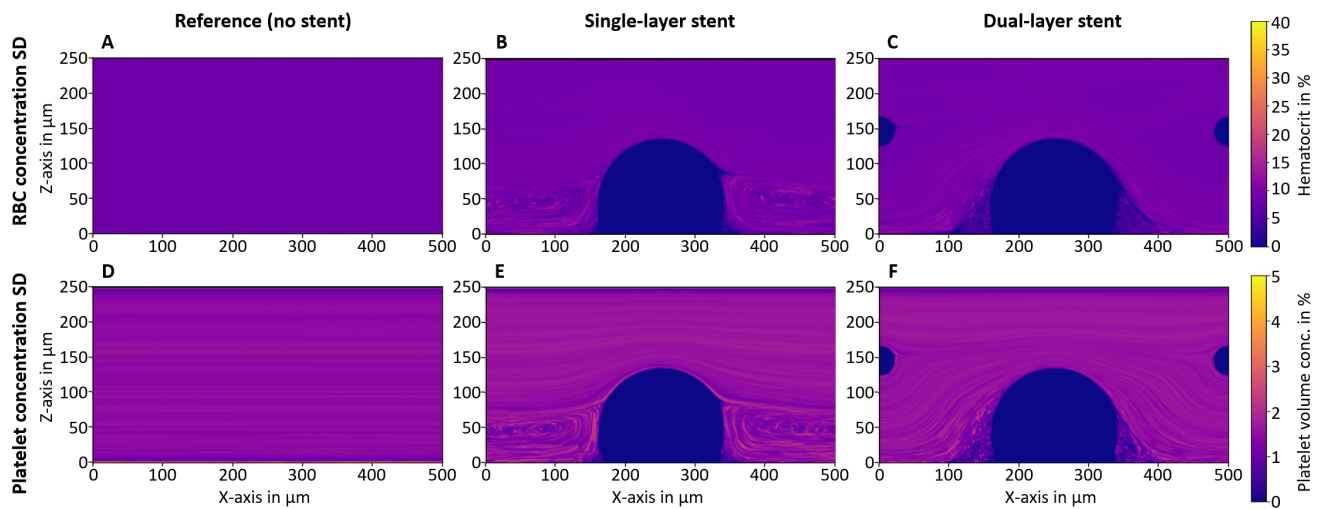


Figure 14: Cell volume concentration standard deviation (SD) across X- and Z-axis for the (A) *reference* (no stent), (B) *single-layer* and (C) *dual-layer* stent, respectively. SDs stem from averaging across the Y-axis and over multiple time steps. Flow is driven in positive X-direction.

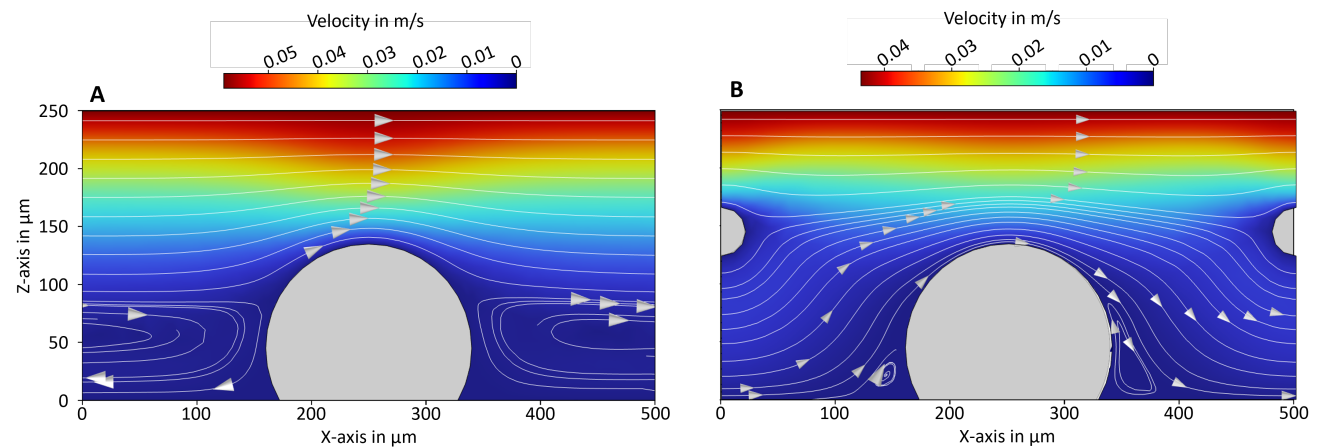


Figure 15: Microscale COMSOL Multiphysics simulation results: Fluid streamlines superimposed on cross-sectional velocity profile for *single-layer* case in A and *dual-layer* case in B. The results are qualitatively matching the HemoCell streamlines in Figs. 7 and 8. Dynamic viscosity adjusted to 2.5 mPas to match lower local hematocrit of 25% [66, 47].

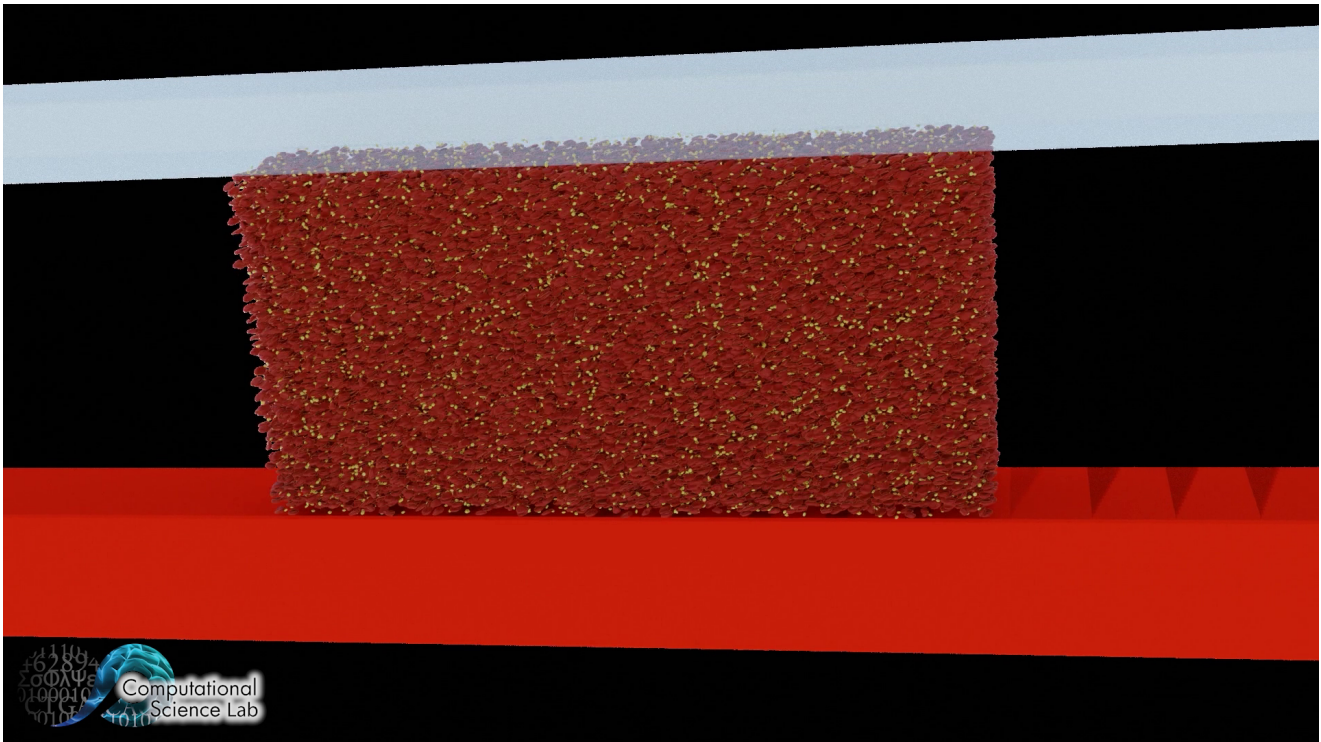


Figure 16: Animation of the non-stented *reference* case simulation in HemoCell from $t = 0$ to $t = 1$ s of simulated flow with the bottom wall colored in red. The simulated domain is limited to the cuboid volume that contains the cells, though the periodic boundary condition in X-dimension directs the flow to continuously bypass the stent struts. The RBCs and platelets within the cuboid volume are colored in dark red and yellow, respectively.

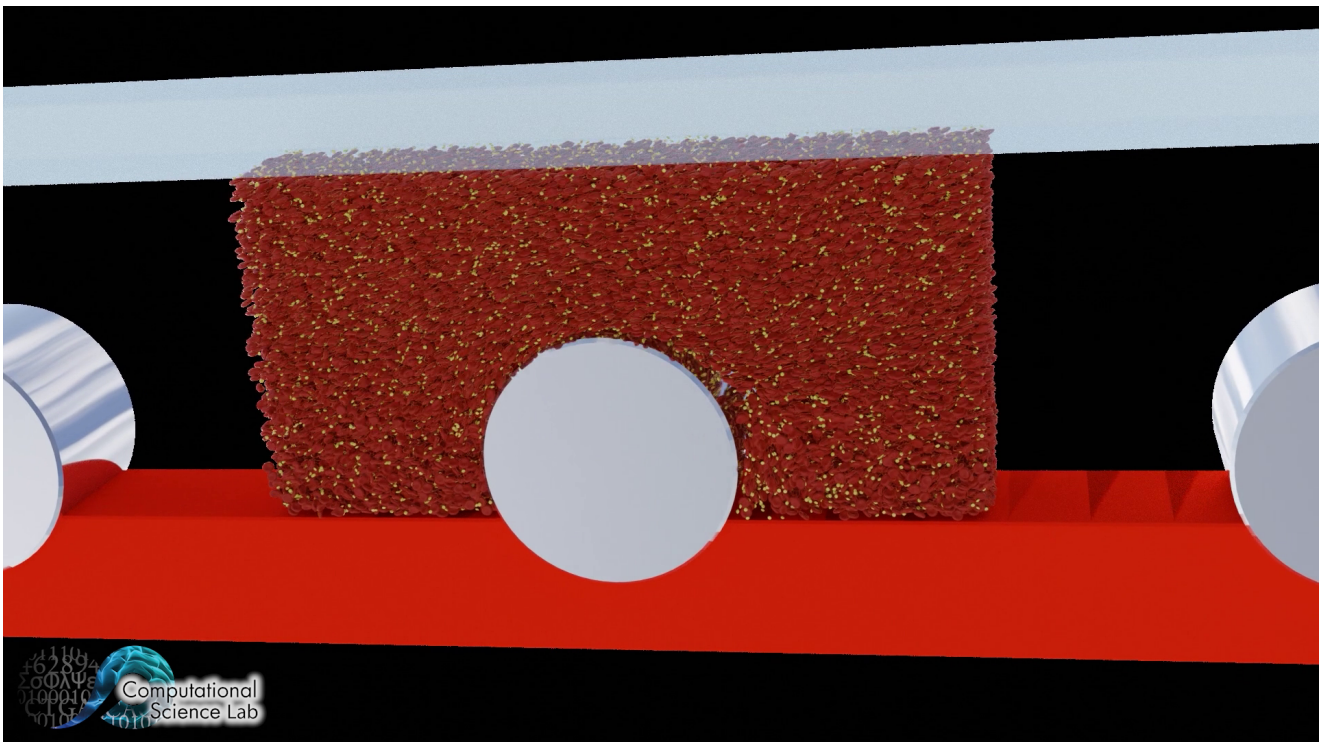


Figure 17: Animation of the *single-layer* case simulation in HemoCell from $t = 0$ to $t = 1$ s of simulated flow with the strut locations in grey metallic appearance and the bottom wall colored in red. The simulated domain is limited to the cuboid volume that contains the cells, though the periodic boundary condition in X-dimension directs the flow to continuously bypass the stent struts. The RBCs and platelets within the cuboid volume are colored in dark red and yellow, respectively.

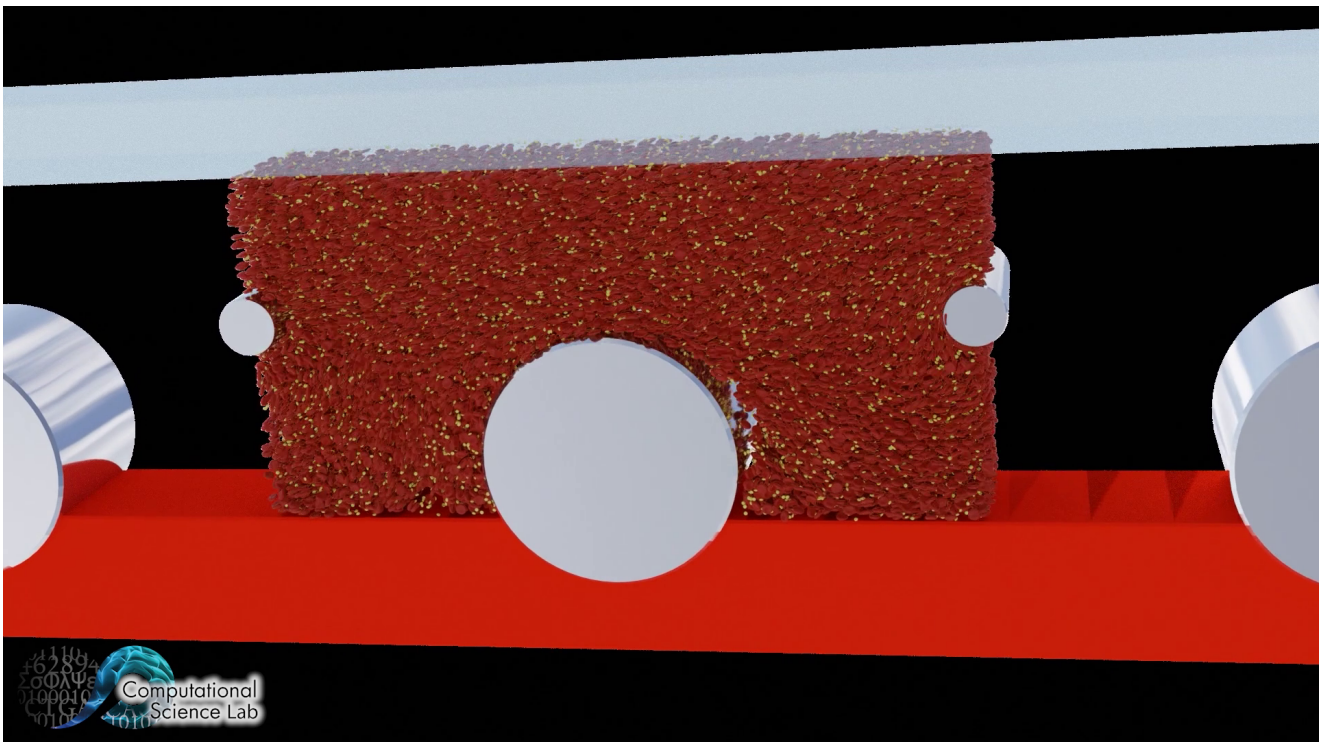


Figure 18: Animation of the *dual-layer* case simulation in HemoCell from $t = 0$ to $t = 1$ s of simulated flow with the strut locations in grey metallic appearance and the bottom wall colored in red. The simulated domain is limited to the cuboid volume that contains the cells, though the periodic boundary condition in X-dimension directs the flow to continuously bypass the stent struts. The RBCs and platelets within the cuboid volume are colored in dark red and yellow, respectively.

References

- [1] Aarts, P.A., van den Broek, S.A., Prins, G.W., Kuiken, G.D., Sixma, J.J., Heethaar, R.M., 1988. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association*, Inc. 8, 819–824. URL: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.8.6.819>, doi:10.1161/01.ATV.8.6.819.
- [2] Angelini, A., Reimers, B., Barbera, M.D., Saccà, S., Pasquetto, G., Cernetti, C., Valente, M., Pascotto, P., Thiene, G., 2002. Cerebral protection during carotid artery stenting. *Stroke* 33, 456–461. doi:10.1161/hs0202.102337.
- [3] Benetos, A., Simon, A., Levenson, J., Lagneau, P., Bouthier, J., Safar, M., 1985. Pulsed doppler: an evaluation of diameter, blood velocity and blood flow of the common carotid artery in patients with isolated unilateral stenosis of the internal carotid artery. *Stroke* 16, 969–972. doi:10.1161/01.str.16.6.969.
- [4] Bergmeier, W., Hynes, R.O., 2011. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a005132–a005132. doi:10.1101/cshperspect.a005132.
- [5] Byrne, R.A., Stone, G.W., Ormiston, J., Kastrati, A., 2017. Coronary balloon angioplasty, stents, and scaffolds. *The Lancet* 390, 781–792. doi:10.1016/s0140-6736(17)31927-x.
- [6] Caiazzo, A., Evans, D., Falcone, J.L., Hegewald, J., Lorenz, E., Stahl, B., Wang, D., Bernsdorf, J., Chopard, B., Gunn, J., Hose, R., Krafczyk, M., Lawford, P., Smallwood, R., Walker, D., Hoekstra, A., 2011. A complex automata approach for in-stent restenosis: Two-dimensional multiscale modelling and simulations. *Journal of Computational Science* 2, 9–17. doi:10.1016/j.jocs.2010.09.002.
- [7] Capoccia, L., Sirignano, P., Mansour, W., d'Adamo, A., Sbarigia, E., Mariani, P., Biasi, C.D., Speziale, F., 2019. Peri-procedural brain lesions prevention in CAS (3pcas): Randomized trial comparing CGuard™ stent vs. wallstent™. *International Journal of Cardiology* 279, 148–153. doi:10.1016/j.ijcard.2018.09.066.
- [8] Chesnutt, J.K., Han, H.C., 2015. Simulation of the microscopic process during initiation of stent thrombosis. *Computers in Biology and Medicine* 56, 182–191. doi:10.1016/j.combiomed.2014.11.006.
- [9] Chesnutt, J.K.W., Han, H.C., 2016. Computational simulation of platelet interactions in the initiation of stent thrombosis due to stent malapposition. *Physical Biology* 13, 016001. doi:10.1088/1478-3975/13/1/016001.
- [10] Cutlip, D.E., Baim, D.S., Ho, K.K.L., Popma, J.J., Lansky, A.J., Cohen, D.J., Carrozza, J.P., Chauhan, M.S., Rodriguez, O., Kuntz, R.E., 2001. Stent thrombosis in the modern era. *Circulation* 103, 1967–1971. doi:10.1161/01.cir.103.15.1967.
- [11] Czaja, B., de Bouter, J., Heisler, M., Závodszy, G., Karst, S., Sarunic, M., Maberley, D., Hoekstra, A., 2022. The effect of stiffened diabetic red blood cells on wall shear stress in a reconstructed 3d micro-aneurysm. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 25, 1691–1709. doi:10.1080/10255842.2022.2034794.
- [12] Czaja, B., Gutierrez, M., Závodszy, G., de Kanter, D., Hoekstra, A., Eniola-Adefeso, O., 2020. The influence of red blood cell deformability on hematocrit profiles and platelet margination. *PLOS Computational Biology* 16, e1007716. URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1007716>, doi:10.1371/journal.pcbi.1007716.
- [13] Diaz, O., Lopez, G., Roehm, J.O.F., la Rosa, G.D., Orozco, F., Almeida, R., 2017. The casper carotid artery stent: a unique all metal micromesh stent designed to prevent embolic release. *Journal of NeuroInterventional Surgery* 10, 133–136. doi:10.1136/neurintsurg-2016-012913.
- [14] Evans, D., Lawford, P., Gunn, J., Walker, D., Hose, D., Smallwood, R., Chopard, B., Krafczyk, M., Bernsdorf, J., Hoekstra, A., 2008. The application of multiscale modelling to the process of development and prevention of stenosis in a stented coronary artery. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 366, 3343–3360. doi:10.1098/rsta.2008.0081.
- [15] Falk, E., 1991. Coronary thrombosis: Pathogenesis and clinical manifestations. *The American Journal of Cardiology* 68, B28–B35. doi:10.1016/0002-9149(91)90382-u.
- [16] Flaherty, M.L., Kissela, B., Khoury, J.C., Alwell, K., Moomaw, C.J., Woo, D., Khatri, P., Ferioli, S., Adeoye, O., Broderick, J.P., Kleindorfer, D., 2012. Carotid artery stenosis as a cause of stroke. *Neuroepidemiology* 40, 36–41. doi:10.1159/000341410.
- [17] Foin, N., Lu, S., Ng, J., Bulluck, H., Hausenloy, D., Wong, P., Virmani, R., Joner, M., 2017. Stent malapposition and the risk of stent thrombosis: mechanistic insights from an in vitro model. *EuroIntervention* 13, e1096–e1098. doi:10.4244/eij-d-17-00381.
- [18] Frank, A.O., Walsh, P.W., Moore, J.E., 2002. Computational fluid dynamics and stent design. *Artificial Organs* 26, 614–621. doi:10.1046/j.1525-1594.2002.07084.x.
- [19] Fu, H., Jiang, Y., Yang, D., Scheiflinger, F., Wong, W.P., Springer, T.A., 2017. Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nature Communications* 8, 324. URL: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00230-2>, doi:10.1038/s41467-017-00230-2.
- [20] Gijssen, F.J., Migliavacca, F., Schievano, S., Socci, L., Petrini, L., Thury, A., Wentzel, J.J., van der Steen, A.F., Serruys, P.W., Dubini, G., 2008. Simulation of stent deployment in a realistic human coronary artery. *BioMedical Engineering OnLine* 7, 23. doi:10.1186/1475-925x-7-23.
- [21] Giustino, G., Kirtane, A.J., Généreux, P., Baber, U., Witzensbichler, B., Neumann, F.J., Weisz, G., Maehara, A., Rinaldi, M.J., Metzger, C., Henry, T.D., Cox, D.A., Duffy, P.L., Mazzaferri, E.L., Brodie, B.R., Stuckey, T.D., Dangas, G.D., Fracesse, D.P., Litherland, C., Mehran, R., Stone, G.W., 2016. Relation between platelet count and platelet reactivity to thrombotic and bleeding risk: From the assessment of dual antiplatelet therapy with drug-eluting stents study. *The American Journal of Cardiology* 117, 1703–1713. doi:10.1016/j.amjcard.2016.03.001.
- [22] Goldsmith, H.L., Turitto, V.T., 1986. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: Basic principles and applications. *Thrombosis and Haemostasis* 55, 415–435. doi:10.1055/s-0038-1661576.
- [23] Gopalakrishnan, M., Lotfi, A., 2017. Stent thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 44, 046–051. doi:10.1055/s-0037-1606178.
- [24] Gori, T., Polimeni, A., Indolfi, C., Räber, L., Adriaenssens, T., Münzel, T., 2018. Predictors of stent thrombosis and their implications for clinical practice. *Nature Reviews Cardiology* 16, 243–256. doi:10.1038/s41569-018-0118-5.
- [25] Gouëffic, Y., Schiava, N.D., Thaveau, F., Rosset, E., Favre, J.P., du Mont, L.S., Alsac, J.M., Hassen-Khodja, R., Reix, T., Allaire, E., Ducasse, E., Soler, R., Guyomar'h, B., Nasr, B., 2017. Stenting or surgery for de novo common femoral artery stenosis. *JACC: Cardiovascular Interventions* 10, 1344–1354. doi:10.1016/j.jcin.2017.03.046.
- [26] Iqbal, J., Gunn, J., Serruys, P.W., 2013. Coronary stents: historical development, current status and future directions. *British Medical Bulletin* 106, 193–211. doi:10.1093/bmb/ldt009.
- [27] Jiménez, J.M., Davies, P.F., 2009. Hemodynamically driven stent strut design. *Annals of Biomedical Engineering* 37, 1483–1494. doi:10.1007/s10439-009-9719-9.
- [28] Kang, S.H., Chae, I.H., Park, J.J., Lee, H.S., Kang, D.Y., Hwang, S.S., Youn, T.J., Kim, H.S., 2016. Stent thrombosis with drug-eluting stents and bioresorbable scaffolds. *JACC: Cardiovascular Interventions* 9, 1203–1212. doi:10.1016/j.jcin.2016.03.038.
- [29] Karel, M.F.A., Lemmens, T.P., Tullemans, B.M.E., Wielders, S.J.H., Gubbins, E., van Beurden, D., van Rijt, S., Cosemans, J.M.E.M., 2021. Characterization of atherosclerotic plaque coating for thrombosis microfluidics assays. *Cellular and Molecular Bioengineering* 15, 55–65. doi:10.1007/s12195-021-00713-9.
- [30] Kern, A.Y., Kreinin, Y., Charle, L., Epshtrein, M., Korin, N., Mangin, P.H., 2024. A macrofluidic model to investigate the intrinsic thrombogenicity of clinically used stents and develop less thrombogenic stents. *Heliyon* 10, e26550. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26550.
- [31] Kim, D.A., Ku, D.N., 2022. Structure of shear-induced platelet aggregated clot formed in an in vitro arterial thrombosis model. *Blood Advances* 6, 2872–2883. doi:10.1182/bloodadvances.2021006248.

- [32] Klail, T., Kurmann, C., Kaesmacher, J., Mujanovic, A., Piechowiak, E.I., Dobrocky, T., Pilgram-Pastor, S., Scutelnic, A., Heldner, M.R., Gralla, J., Mordasini, P., 2022. Safety and efficacy of carotid artery stenting with the CGuard double-layer stent in acute ischemic stroke. *Clinical Neuroradiology* 33, 237–244. doi:10.1007/s00062-022-01209-3.
- [33] Knupp, P., 2011. Introducing the target-matrix paradigm for mesh optimization via node-movement. *Engineering with Computers* 28, 419–429. doi:10.1007/s00366-011-0230-1.
- [34] Knupp, P.M., 2001. Algebraic mesh quality metrics. *SIAM Journal on Scientific Computing* 23, 193–218. doi:10.1137/s1064827500371499.
- [35] Krejza, J., Arkuszewski, M., Kasner, S.E., Weigele, J., Ustymowicz, A., Hurst, R.W., Cucchiara, B.L., Messe, S.R., 2006. Carotid artery diameter in men and women and the relation to body and neck size. *Stroke* 37, 1103–1105. doi:10.1161/01.str.0000206440.48756.f7.
- [36] Lichtman, J.H., Jones, M.R., Leifheit, E.C., Sheffet, A.J., Howard, G., Lal, B.K., Howard, V.J., Wang, Y., Curtis, J., Brott, T.G., 2017. Carotid endarterectomy and carotid artery stenting in the US medicare population, 1999–2014. *JAMA* 318, 1035. doi:10.1001/jama.2017.12882.
- [37] Liu, Z.L., Ku, D.N., Aidun, C.K., 2021. Mechanobiology of shear-induced platelet aggregation leading to occlusive arterial thrombosis: A multiscale in silico analysis. *Journal of Biomechanics* 120, 110349. doi:10.1016/j.jbiomech.2021.110349.
- [38] Mescher, A.L., 2018. *Blood*. McGraw-Hill Education, New York, NY. URL: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160662248.
- [39] Montorsi, P., Caputi, L., Galli, S., Ravagnani, P.M., Teruzzi, G., Annoni, A., Calligaris, G., Fabbiochi, F., Trabattoni, D., de Martini, S., Grancini, L., Pontone, G., Andreini, D., Troiano, S., Restelli, D., Bartorelli, A.L., 2020. Carotid wallstent versus roadsaver stent and distal versus proximal protection on cerebral microembolization during carotid artery stenting. *JACC: Cardiovascular Interventions* 13, 403–414. doi:10.1016/j.jcin.2019.09.007.
- [40] Moulakakis, K.G., Mylonas, S.N., Lazaris, A., Tsivgoulis, G., Kakisis, J., Sfyroeras, G.S., Antonopoulos, C.N., Broutzos, E.N., Vasdekis, S.N., 2016. Acute carotid stent thrombosis. *Vascular and Endovascular Surgery* 50, 511–521. doi:10.1177/1538574416665986.
- [41] Mountrakis, L., Azizi, V., Závodszy, G., Max, J., Jdebuter, AlekseyBelyaev, Joo-Kovacs, R., Alowayyeds, Spieker, C., Erincolez, MJdeHaan, Kostis Asteriou, 2023. *Uvacsl/hemocell: Hemocell v2.7*. doi:10.5281/ZENODO.7713548.
- [42] Nishihira, K., Yamashita, A., Ishikawa, T., Hatakeyama, K., Shibata, Y., Asada, Y., 2010. Composition of thrombi in late drug-eluting stent thrombosis versus de novo acute myocardial infarction. *Thrombosis Research* 126, 254–257. doi:10.1016/j.thromres.2009.11.010.
- [43] Palmerini, T., Biondi-Zoccai, G., Riva, D.D., Mariani, A., Genereux, P., Branzi, A., Stone, G.W., 2013. Stent thrombosis with drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 1915–1921. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.725.
- [44] Pfaff, J.A.R., Maurer, C., Broussalis, E., Janssen, H., Blanc, R., Dargazanli, C., Costalat, V., Piotin, M., Runck, F., Berlis, A., Killer-Oberpfalzer, M., Hensler, J.T., Bendszus, M., Wodarg, F., Möhlenbruch, M.A., 2019. Acute thromboses and occlusions of dual layer carotid stents in endovascular treatment of tandem occlusions. *Journal of NeuroInterventional Surgery* 12, 33–37. doi:10.1136/neurintsurg-2019-015032.
- [45] Pop, R., Hasiu, A., Mangin, P., Severac, F., Mihoc, D., Nistoran, D., Manisor, M., Simu, M., Chibbaro, S., Gheoca, R., Quenardelle, V., Rouyer, O., Wolff, V., Beaujeux, R., 2021. Postprocedural antiplatelet treatment after emergent carotid stenting in tandem lesions stroke: Impact on stent patency beyond day 1. *American Journal of Neuroradiology* 42, 921–925. doi:10.3174/ajnr.a6993.
- [46] Pop, R., Zinchenko, I., Quenardelle, V., Mihoc, D., Manisor, M., Richter, J., Severac, F., Simu, M., Chibbaro, S., Rouyer, O., Wolff, V., Beaujeux, R., 2019. Predictors and clinical impact of delayed stent thrombosis after thrombectomy for acute stroke with tandem lesions. *American Journal of Neuroradiology* doi:10.3174/ajnr.a5976.
- [47] Pries, A.R., Neuhaus, D., Gaetgens, P., 1992. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 263, H1770–H1778. URL: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1770>, doi:10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1770.
- [48] Renú, A., Blasco, J., Laredo, C., Llull, L., Urra, X., Obach, V., López-Rueda, A., Rudilosso, S., Zarco, F., González, E., Guio, J.D., Amaro, S., Chamorro, A., 2020. Carotid stent occlusion after emergent stenting in acute ischemic stroke: Incidence, predictors and clinical relevance. *Atherosclerosis* 313, 8–13. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.002.
- [49] Riegger, J., Byrne, R.A., Joner, M., Chandraratne, S., Gershlick, A.H., ten Berg, J.M., Adriaenssens, T., Guagliumi, G., Godschalk, T.C., Neumann, F.J., Trenk, D., Feldman, L.J., Steg, P.G., Desmet, W., Alfonso, F., Goodall, A.H., Wojdyla, R., Dudek, D., Philippi, V., Opinaldo, S., Titova, A., Malik, N., Cotton, J., Jhagroe, D.A., Heestermans, A.A., Sinnaeve, P., Vermeersch, P., Valina, C., Schulz, C., Kastrati, A., Massberg, S., 2015. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. a multicenter european study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global european effort consortium. *European Heart Journal* 37, 1538.1–1549. doi:10.1093/eurheartj/ehv419.
- [50] van Rooij, B.J.M., Závodszy, G., Hoekstra, A.G., Ku, D.N., 2020. Biorheology of occlusive thrombi formation under high shear: in vitro growth and shrinkage. *Interface Focus* 10. doi:10.1038/s41598-020-74518-7.
- [51] van Rooij, B.J.M., Závodszy, G., Hoekstra, A.G., Ku, D.N., 2021. Haemodynamic flow conditions at the initiation of high-shear platelet aggregation: a combined in vitro and cellular in silico study. *Interface Focus* 11, 20190126. URL: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsfs.2019.0126>, doi:10.1098/rsfs.2019.0126.
- [52] Sadowski, M., Ząbczyk, M., Undas, A., 2014. Coronary thrombus composition: Links with inflammation, platelet and endothelial markers. *Atherosclerosis* 237, 555–561. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.020.
- [53] Schneider, S.W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R.R., Schneider, M.F., 2007. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7899–7903. URL: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608422104>, doi:10.1073/pnas.0608422104.
- [54] Sing, C.E., Alexander-Katz, A., 2010. Elongational Flow Induces the Unfolding of von Willebrand Factor at Physiological Flow Rates. *Biophysical Journal* 98, L35–L37. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349510001979>, doi:10.1016/j.bpj.2010.01.032.
- [55] Spieker, C.J., Asteriou, K., Závodszy, G., 2023a. Simulating initial steps of platelet aggregate formation in a cellular blood flow environment, in: *Computational Science – ICCS 2023*. Springer Nature Switzerland, pp. 323–336. doi:10.1007/978-3-031-36024-4_26.
- [56] Spieker, C.J., Závodszy, G., Mouriaux, C., van der Kolk, M., Gachet, C., Mangin, P.H., Hoekstra, A.G., 2021. The effects of microvessel curvature induced elongational flows on platelet adhesion. *Annals of Biomedical Engineering* 49, 3609–3620. doi:10.1007/s10439-021-02870-4.
- [57] Spieker, C.J., Závodszy, G., Mouriaux, C., Mangin, P.H., Hoekstra, A.G., 2023b. Initial platelet aggregation in the complex shear environment of a punctured vessel model. *Physics of Fluids* 35. doi:10.1063/5.0157814.
- [58] Spronk, E., Sykes, G., Falcione, S., Munsterman, D., Joy, T., Kamtchum-Tatuene, J., Jickling, G.C., 2021. Hemorrhagic transformation in ischemic stroke and the role of inflammation. *Frontiers in Neurology* 12. doi:10.3389/fneur.2021.661955.
- [59] Sýkora, J., Zeleňák, K., Vorčák, M., Števík, M., Sýkorová, M., Sivák, J., Rovňák, M., Zapletalová, J., Mužík, J., Šinák, I., Kurča, E., Meyer, L., Fiehler, J., 2022. Comparison of restenosis risk in single-layer versus dual-layer carotid stents: A duplex ultrasound evaluation. *CardioVascular and Interventional Radiology* 45, 1257–1266. doi:10.1007/s00270-022-03200-4.

- [60] Tabakova, S., Nikolova, E., Radev, S., 2014. Carreau model for oscillatory blood flow in a tube, in: AIP Conference Proceedings, AIP Publishing LLC. doi:10.1063/1.4902290.
- [61] Tanigawa, J., Barlis, P., Dimopoulos, K., Dalby, M., Moore, P., Di Mario, C., 2009. The influence of strut thickness and cell design on immediate apposition of drug-eluting stents assessed by optical coherence tomography. *International Journal of Cardiology* 134, 180–188. doi:10.1016/j.ijcard.2008.05.069.
- [62] Torrado, J., Buckley, L., Durán, A., Trujillo, P., Toldo, S., Raleigh, J.V., Abbate, A., Biondi-Zoccai, G., Guzmán, L.A., 2018. Restenosis, stent thrombosis, and bleeding complications. *Journal of the American College of Cardiology* 71, 1676–1695. doi:10.1016/j.jacc.2018.02.023.
- [63] Virmani, R., Guagliumi, G., Farb, A., Musumeci, G., Grieco, N., Motta, T., Mihalsik, L., Tsepili, M., Valsecchi, O., Kolodgie, F.D., 2004. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent. *Circulation* 109, 701–705. doi:10.1161/01.cir.0000116202.41966.d4.
- [64] Vos, J.A., 2017. Evidence overview: benefit of cerebral protection devices during carotid artery stenting. *The Journal of Cardiovascular Surgery* 58. doi:10.23736/s0021-9509.16.09848-7.
- [65] de Vries, E.E., Vonken, E.J., Kappelle, L.J., Toorop, R.J., de Borst, G.J., 2019. Short-term double layer mesh stent patency for emergent or elective carotid artery stenting. *Stroke* 50, 1898–1901. doi:10.1161/strokeaha.118.024586.
- [66] Wells, R.E., Merrill, E.W., et al., 1962. Influence of flow properties of blood upon viscosity-hematocrit relationships. *The Journal of clinical investigation* 41, 1591–1598.
- [67] Wessler, S., 1962. Thrombosis in the presence of vascular stasis. *The American Journal of Medicine* 33, 648–666. doi:10.1016/0002-9343(62)90244-9.
- [68] White, C.J., 2014. Carotid artery stenting. *Journal of the American College of Cardiology* 64, 722–731. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.069.
- [69] Wissgott, C., Schmidt, W., Brandt, C., Behrens, P., Andresen, R., 2015. Preliminary clinical results and mechanical behavior of a new double-layer carotid stent. *Journal of Endovascular Therapy* 22, 634–639. doi:10.1177/1526602815593490.
- [70] Yilmaz, U., Körner, H., Mühl-Benninghaus, R., Simgen, A., Kraus, C., Walter, S., Behnke, S., Faßbender, K., Reith, W., Unger, M.M., 2017. Acute occlusions of dual-layer carotid stents after endovascular emergency treatment of tandem lesions. *Stroke* 48, 2171–2175. doi:10.1161/strokeaha.116.015965.
- [71] Zavodszky, G., Spieker, C., Czaja, B., van Rooij, B., 2023. Cellular blood flow modeling with HemoCell, in: *Methods in Molecular Biology*. Springer US, pp. 351–368. doi:10.1007/978-1-0716-3449-3_16.
- [72] Zavodszky, G., Van Rooij, B., Azizi, V., Alowayyed, S., Hoekstra, A., 2017. Hemocell: A high-performance microscopic cellular library, in: *Procedia Computer Science*, Elsevier B.V., pp. 159–165. doi:10.1016/j.procs.2017.05.084.
- [73] Závodszky, G., Van Rooij, B., Czaja, B., Azizi, V., De Kanter, D., Hoekstra, A.G., 2019. Red blood cell and platelet diffusivity and margination in the presence of cross-stream gradients in blood flows. *Physics of Fluids* 31. doi:10.1063/1.5085881.
- [74] Zun, P.S., Anikina, T., Svitenkov, A., Hoekstra, A.G., 2017. A comparison of fully-coupled 3d in-stent restenosis simulations to in-vivo data. *Frontiers in Physiology* 8. doi:10.3389/fphys.2017.00284.

Conclusion

Lors de la mise au point du modèle *in vitro* de thrombose de stent carotidien, combinant ses deux déterminants, c'est-à-dire un extrait de matériel de plaque de carotide (ou du collagène) et un stent carotidien, j'ai observé une diminution surprenante et inattendue de l'agrégation plaquettaire en présence d'un stent à double couche, le Casper, par rapport au témoin où seule de la plaque était présente. Cette diminution d'agrégation a également été observée sur un second stent carotidien, le Wallstent, à simple couche. En collaboration avec une équipe de mathématiciens néerlandais, nous avons montré *in silico* que les mailles des deux modèles de stent réduisent la disponibilité des plaquettes à proximité de la paroi du vaisseau. La résolution au niveau cellulaire des simulations révèle une influence significative des régions de recirculation des deux stents sur la disponibilité locale des plaquettes par rapport à une configuration de référence non stentée. Cette observation décrit un « effet protecteur » des stents qui n'était pas connu à ce jour et ouvre la perspective très intéressante d'exploiter cet effet afin de générer de nouveaux stents avec des mailles dont la structure modifie les écoulements et qui auraient un potentiel thrombogène diminué. Par ailleurs, l'introduction d'une couche interne dans le stent bicouche augmente le taux de cisaillement local et le taux d'élongation au sommet de la couche interne. De plus, la disponibilité locale des plaquettes est accrue. Ces effets pro-thrombogènes pourraient expliquer pourquoi ce stent est plus thrombogène en clinique.

Ce manuscrit présente une nouvelle approche pour étudier la conception des stents, pour mieux caractériser leur processus d'optimisation à l'avenir. La résolution cellulaire des simulations révèle l'influence significative que les régions de recirculation autour des mailles des stents ont sur les distributions cellulaires locales. Ces facteurs pourraient jouer un rôle important dans le développement futur de modèles de stents visant à réduire la thrombose de stent : l'optimisation de la forme des régions de recirculation par de petits ajustements dans l'agencement du stent pourrait influencer de manière significative la disponibilité locale des plaquettes et, par conséquent, le risque de thrombose de stent.

**La GPVI, une cible intéressante dans la prévention
de la thrombose de stent**

Publication 6 :

« Targeting GPVI to prevent stent thrombosis »

Axelle Y. Kern *et al.*

En préparation.

Introduction

La thrombose de stent est une complication de la pose d'un stent dans une artère sténosée et malade. L'utilisation systématique d'une bithérapie antiplaquettaire, combinant l'aspirine à un antagoniste du récepteur P2Y₁₂, a permis d'en réduire son incidence de manière importante au niveau des coronaires (< 1 %) et de la fémorale (6,1 %). Toutefois, son incidence reste très élevée au niveau de la carotide, estimée à environ 20 %. Cela s'explique par le fait que les patients ne sont soumis qu'à une monothérapie d'aspirine, et non à la bithérapie antiplaquettaire, afin de limiter les saignements intracrâniens, très délétères dans cet organe. La nécessité d'un nouvel agent antiplaquettaire efficace et sans risque de saignement a conduit au développement du glenzocimab, un fragment d'anticorps humanisé dirigé contre la GPVI. Il a été montré dans un essai clinique de phase I chez des volontaires sains et dans un essai de phase Ib/IIa chez des malades, que cet agent est sûr puisqu'il n'entraîne pas d'augmentation des saignements.

L'objectif de ce sixième article est de comparer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité du glenzocimab par rapport au traitement de référence clinique dans la prévention de la thrombose de stent. Pour le moment, nous nous sommes intéressés à l'effet du glenzocimab en comparaison des antiplaquettaires utilisés en clinique dans la carotide et la fémorale. Pour cela, nous avons utilisé le dispositif macrofluidique précédemment décrit dans l'article 2 (Kern *et al*, Heliyon 2024). J'ai mis au point un modèle *in vitro* de thrombose de stent, dans lequel la chambre fémorale ou carotidienne est recouverte d'un homogénat de plaque d'athérosclérose humaine, afin de reproduire la thrombogénicité d'une artère malade et donc de pouvoir mimer une thrombose de stent.

Les travaux concernant ce projet sont toujours en cours au laboratoire.

Targeting GPVI to prevent stent thrombosis

Axelle Y. Kern *et al.*

CHAPTER 1: INTRODUCTION

Ischemic pathologies, such as myocardial infarction, ischemic stroke or peripheral arterial disease, often result from a thrombosis occurring after the rupture of an atherosclerotic plaque. Clinicians do not only treat the ongoing thrombosis with antiplatelet agents, but they also reopen the stenosed vessel with angioplasty and stenting. A major complication of stent implantation is stent thrombosis (ST). Carotid ST has been determined to be an independent predictor of poor neurological outcomes in stroke patients. In addition, ST presents a very elevated mortality rate in patients that underwent coronary angioplasty as it can lead to a new myocardial infarction or cardiogenic shock when occurring in the coronary arteries [1–4]. Concerning patients undergoing ST in lower limbs, they present a high risk of amputation which is a major concern for the quality of life [5]. The incidence of ST has been dramatically reduced over the last decades, going from 20-25 % down to less than 1 % in the coronaries, thanks to the use of dual antiplatelet therapy, combining aspirin with a P2Y₁₂ antagonist [6,7]. However, it remains a challenge in the lower limbs where dual antiplatelet therapy has a limited affect and does not reduce the incidence of ST below 6.1 % in the femoral artery [5]. Moreover, recent reports suggest that the incidence of ST in emergent carotid stenting is very elevated, exceeding 20 % [8–10]. This high incidence is most likely explained by the fact that the antithrombotic strategy in this indication is limited to the use of aspirin as a monotherapy, and thereby providing a limited antiplatelet protection. The rationale of using this pharmacological strategy in this setting is to limit the risk of haemorrhagic transformation of stroke and/or intracranial bleeding, which would be very deleterious to the patients [1,10–12]. It is therefore essential to propose new pharmacological strategies to prevent ST, which efficiently prevent thrombus formation, without bleeding risk for the patient.

Platelet glycoprotein (GP) VI has long been established as a major receptor for arterial thrombosis, but not haemostasis in mice and in humans. Indeed, patients with a defect or absence of GPVI do not experience a major bleeding diathesis [13–15], which is confirmed in mice deficient for GPVI, showing no prolongation of tail bleeding time, and no increase in blood lost [14,16,17]. The important role of GPVI in atherothrombosis has been evidenced in experimental models, in which the atherosclerotic plaques of ApoE^{-/-} deficient mice were ruptured with ultrasound or a needle [18,19]. These results indicate that GPVI represents an attractive antithrombotic target devoid of bleeding risk.

Glenzocimab is an antibody fragment directed against human GPVI, developed by the French biotech company, Acticor Biotech. This drug candidate is a high-affinity reversible inhibitor of GPVI, which prevents platelet activation and aggregation and thus thrombus formation [20–22]. Its predecessor, the murine antibody 9O12, has been shown to reduce experimental thrombosis in mice humanized for GPVI [23]. In primates, ACT017, its humanised version, has been shown to inhibit collagen-induced platelet aggregation *ex vivo* without reducing platelet counts or inducing haemorrhagic side effects [21]. In a phase I clinical trial, ACT017 showed no major adverse events, no increased bleeding time and no altered platelet count or platelet GPVI expression after administration to healthy volunteers [24,25]. The ACTIMIS trial, a phase Ib/IIa study (NCT038030037), which evaluated the effect of glenzocimab in addition to standard therapy (thrombolysis and/or thrombectomy) in the treatment of ischemic stroke, confirmed that this agent is safe. Interestingly, this trial indicated that glenzocimab decreases the frequency of haemorrhagic transformation thereby reducing mortality by threefold compared to the placebo arm [22,26,27]. More recently, a phase II/III study, ACTISAVE, has confirmed the safety of glenzocimab in stroke patients, but without reduction of the NIHSS score (ACTISAVE, NCT05070260).

As glenzocimab represents a very safe antithrombotic agent, and much safer than the antiplatelet agents currently used in clinic, and since it blocks the interaction between GPVI and collagen, which is over expressed in atherosclerotic plaques, we propose that it would represent an ideal approach to prevent ST. This study aims to assess the efficacy of glenzocimab in comparison and combination of the standard of care to prevent ST in two different vascular territories, the femoral and the carotid artery. To do so, we used a macrofluidic model [28] and set up a novel ST model, that has the advantage to be adapted to any vessel of interest. We compared the efficacy of glenzocimab to the standard of care in both a model carotid and femoral stent thrombosis.

CHAPTER 2: MATERIALS & METHODS

Materials

The 3D printer Form 3B+ and its UV resin are from Formlabs GmbH (Germany), the PDMS (Sylgard 184) is from DOW Europe GmbH (France) and the sonicator (Bioblock Vibra cell 75115) from Sonics & Materials (USA). Recombinant hirudin was obtained from Transgene (France) and 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆) from Molecular Probes (UK). Fatty acid-free human serum albumin (HSA), calcium chloride (CaCl₂), magnesium chloride (MgCl₂) and hexamethyl-1,1,1,3,3,3-disilazane (HMDS) were from Sigma-Aldrich (France). The peristaltic pump 530U/R from Watson-Marlow (France), the Leica Z16 APO microscope and LasX software were from Leica Microsystems (France) and the platelet counter Sysmex XN-1000 from Sysmex France (France). Casper carotid artery stent 8x30 mm were from Microvention France (France) and Lifestent femoral stent 6x40 mm from Becton Dickinson, (France). Glutaraldehyde was from Electron Microscopy Sciences (USA). The University Hospital of Strasbourg supplied aspirin, Acticor Biotech the glenzocimab and AstraZeneca the

cangrelor. The antibodies for collagen I and III (PA5-95137, PA5-34787) and lipids ox-LDL (BS-1698R) come from ThermoFisher. The secondary IgG rabbit antibody FITC conjugated come from EMFRET (P180-1).

Fabrication of the carotid and superficial femoral artery chamber

The fabrication of both chambers has been described in details in Kern *et al.* [28]. Briefly, moulds with the lumen skeleton of the artery of interest are 3D-printed and surface is made as smooth as possible. 45 grams of PDMS (1:10 w/w) are poured inside the mould and let to solidify 48 hours at room temperature. The chamber is then immersed in acetone for few days to dissolve the skeleton and obtain the perfusion chamber.

Preparation of the human atherosclerotic plaques homogenate

Human atherosclerotic plaques homogenate (HAPH) are recovered after endarterectomy in the carotid or the femoral from the Vascular Surgery Department of the University Hospital of Strasbourg. A cryo-grinding process using liquid nitrogen and a mortar transforms the plaques into a fine powder, placed in a Falcon tube and diluted in PBS (4 mL / 1 g of powder). The mixture undergoes 20 cycles of sonication lasting 15 seconds at an amplitude of 30 %, alternating with 10 seconds of rest to avoid overheating the sample. The mixture is homogenized by vortexing every five cycles. As this process generates heat, the Falcon tube is immersed in a large Falcon tube filled with ice and water. The resulting homogenate is centrifuged at 2240 g for 10 min at 4°C. The layer of interest, corresponding to the homogeneous layer of the medium, is sampled, weighed and resuspended at 16.5 mg protein/mL wet weight in PBS, as according to Karel *et al.* [29].

Blood collection

All blood donors were healthy volunteers who gave their free and informed written consent to participate in our study, conform to the ethical standards of the Declaration of Helsinki. Legal and ethical authorisation to use the collected blood for research was obtained through a national convention between the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the French Blood Institute (EFS) (convention number I/DAJ/C2675). 45 mL of blood is collected into a tube containing 5 mL hirudin (100 U/mL) and kept at 37°C. The first few millilitres of blood are discarded to avoid platelet activation.

Assemblage of the stent and atherosclerotic plaque material

HAPH was deposited in the internal carotid chamber (500 μ L) or in the femoral artery (1 mL). Chambers were put 1 hour at 37°C in a humid box. They were then passivated with 4 mL of 1 % HSA for 30 min at room temperature and rinsed with PBS supplemented with CaCl₂ (2 mmol/L) and MgCl₂ (1 mmol/L). Clinically used stents (Casper for the carotid, Lifesent for the femoral) were placed in the according flow chamber at a similar position as in patients, using a catheter that allowed stent self-expansion.

Perfusion through the macrofluidic system

The precise description and assemblage of the system has been described in Kern *et al.* [28]. Briefly, the system is composed of a peristaltic pump, a water bath and a fluorescence microscope under which the chamber is placed. The system was primed with 1X PBS to remove air bubbles and check for the absence of leaks. Human whole blood (150 mL) collected into hirudin and incubated with DiOC₆ (1 μ mol/L) to label platelets was then perfused at a flow rate of 380 mL/min (mean average flow rate in human carotid artery [30]) or 200 mL/min

(mean average flow rate in the human superficial femoral artery [31]) for one hour. Antiplatelet agents were let to infuse in the blood reservoir around 5-10 minutes before perfusion.

Immunofluorescence

HAPH from carotid and femoral were coated on PDMS chambers for 1h at 37°C in a humid chamber. Chambers were cut in four pieces and coating was fixed with PFA 4 % and then incubated with PBS – BSA 2 % - Triton 0.1 %, both for 30 min at RT. Antibodies diluted in PBS – BSA 1 % against collagen I (1/100), collagen III (1/500) and lipids ox-LDL (1.100) were incubated 1h at RT. Samples were washed three times for 5 min with PBS – Triton 0.1 %. The secondary antibody (1/200) was incubated in all samples for 1h at RT. Samples were washed three times for 5 min with PBS – Triton 0.1 %, and once for 5 min in distilled water. Samples were observed with a DMI8 microscope.

Computational Fluid Dynamics

Computational fluid dynamics (CFD) simulations were used to investigate the shear stress and flow patterns in a native (*i.e.* non-stented) carotid bifurcation and a femoral artery. The vessels were modelled using the SolidWorks CAD software. For the carotid, we used the microfluidic chamber CAD model. The straight vessel was designed to mimic a 6 mm diameter in the common carotid and the femoral arteries. The models were meshed with ANSYS GAMBIT 21 R2 and the simulations were conducted using ANSYS Fluent 21 R2. The flow simulation conditions were chosen to be a constant laminar incompressible flow. Newtonian rheology was defined according to Johnston *et al.* [32] and the effect of non-Newtonian rheology was found to be important only at low velocities. The average flow rate was taken to be 0.4 L/min

and the dynamic viscosity and density of blood to be 3.5×10^{-3} Pa/s and $\rho = 1080$ kg/m³, respectively. Gravitational forces were assumed to be negligible [33,34].

SEM

Scanning electron microscopy (SEM) is performed as described in Kern *et al.* [28]. Briefly, stents and chamber were fixed with 2.5 % glutaraldehyde, washed with distilled water and dehydrated first in graded ethanol solutions, then HMDS. Sputters of platinum allow the observation under a Hitachi scanning electron microscope (Tokyo, Japan) [35].

Statistics

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, USA). Statistical significance between two groups was evaluated with the Mann-Whitney test or the Student t-test, according the Gaussian law. Statistical significance between several different groups with the Kruskal-Wallis test. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Outliers in Figure 3E were determined by the Grubb's test.

CHAPTER 3: RESULTS

Part 1: Development and characterisation of new macrofluidic model to study carotid stent thrombosis. Stent thrombosis occurs in a stent implanted on an atherosclerotic plaque of a diseased artery. To mimic ST *in vitro*, we developed a flow chamber faithfully reproducing the geometry of the carotid artery, and perfectly well suited to implant clinically used stents (**Figure 1A**). The chamber was coated with human plaque homogenates (16.5 mg of protein/mL wet weight) prepared from carotid plaques collected in patients after

endarterectomy. Using born-type aggregometry and a flow-based assay, we provided evidence that the plaque material is highly thrombogenic (data not shown). After coating the plaque homogenate in the macrofluidic chamber, we used an immunofluorescence (IF) approach to confirm the presence of major thrombogenic components on the chamber including type III collagen, and oxidised lipids (ox-lipids), but not type I collagen (**Figure 1B**). Computational fluid dynamic (CFD) was utilised to show that the flows in the chamber are relevant as they reproduce those found in the human carotid (**Figure 1C**) [36–38]. We then implanted a carotid stent, the Casper, in the chamber after coating plaque material, and perfused human whole blood incubated with DiOC₆ to visualise platelet adhesion in real-time. While fluorescence signal accumulated in the region of the chamber that was coated and stented, no signal was observed in other regions of this chamber as well as in the control chamber (**Figure 1D**). The ability of platelets to accumulate efficiently in the chamber was confirmed by quantification showing a surface area of $368.3 \pm 96.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ in the stented and coated carotid chamber compare to $0.3 \pm 0.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ in the control chamber ($p=0.0025$) (**Figure 1E**). SEM showed that the fluorescence observed in the chamber corresponds to thrombi, which were composed of numerous highly activated platelets, as indicated by their shape change and filopodia emission (**Figure 1F**). These results validate the development of a novel macrofluidic model of carotid ST, which allows efficient platelet adhesion and aggregation on plaque extracts and a stent of a carotid chamber, in in relevant rheological settings.

Part 2: Glencocimab prevents carotid ST as efficiently as aspirin. Nowadays, a monotherapy with aspirin is recommended in stroke patients with a tandem lesion, to provide an antiplatelet protection with limited deleterious intracranial bleeding. To evaluate its impact in

the carotid ST model, aspirin (50 µg/mL) was incubated with human whole blood before perfusion. After 60 min of perfusion, we observed a marked reduction of fluorescence in the aspirin group when compared to the control (saline) (**Figure 2A**). This result was confirmed by a quantification revealing a 90 % decrease of the fluorescent signal (control: $342.4 \pm 65.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; aspirin: $35.4 \pm 8.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0003$) (**Figure 2B**). When whole blood was incubated with glenzocimab (50 µg/mL [24]), we also observed a marked reduction in platelet accumulation as compared to the control, highlighting the potential of glenzocimab to efficiently prevent thrombosis in the carotid ST model (**Figure 2C**). This observation was confirmed by a quantification showing a 82 % reduction in platelet signal (control: $242.9 \pm 54.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; glenzocimab: $44.3 \pm 16 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p=0.0063$) (**Figure 2D**). These results indicate that glenzocimab efficiently prevents thrombosis in the carotid ST model, and could represent a novel therapeutic option in this indication.

Part 3: Development and characterisation of a macrofluidic model to study femoral stent

thrombosis. As ST also represents a medical issue in lower limbs, we developed a femoral ST model, with a flow chamber faithfully reproducing the geometry of the superficial femoral artery (**Figure 3A**). The chamber was coated with human plaque homogenates (16.5 mg of protein/mL wet weight), prepared from femoral plaques collected in patients after endarterectomy, whose reactivity were checked using born-type aggregometry and flow-based assay (data not shown). After coating the plaque homogenates in the chamber, IF approach confirmed the presence of type I collagen, type III collagen, and a little bit of oxidised lipids (ox-lipids) on the walls of the chamber (**Figure 3B**). CFD showed that the flows in the chamber are relevant and reproduce those found in humans (**Figure 3C**) [39]. After implanting a Lifestent in the coated femoral chamber and perfusing human whole blood stained with

DiOC₆, we observed an accumulation of fluorescent signal which was absent in the control chamber (**Figure 3D**). Quantification confirmed the efficient recruitment of platelet signal in the relevant regions of the stented femoral chamber (control: $0.2 \pm 0.01 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; femoral ST: $223.6 \pm 5.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0001$), while SEM highlighted the presence of thrombi rich in activated platelets (**Figures 3E, F**). These results validate the development of a macrofluidic model of ST adapted to the femoral artery.

Part 4: Glenzocimab prevents femoral ST as efficiently as dual antiplatelet therapy. Dual antiplatelet therapy (DAPT), combining aspirin to the P2Y₁₂ blocker cangrelor, is the standard of care for stented patients, notably in the femoral and the coronary arteries. To evaluate the impact of DAPT in our model, aspirin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and cangrelor (0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated with human whole blood before perfusion. After one hour of perfusion, we observed a significant decrease of fluorescence in the DAPT group when compared to the control (saline) (**Figure 4A**). This result was confirmed by a quantification revealing a 61 % decrease of the fluorescent signal (control: $780.3 \pm 48.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; DAPT: $304.6 \pm 65.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p = 0.0021$) (**Figure 4B**). When whole blood was incubated with glenzocimab (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), images showed a marked reduction in platelet accumulation as compared to the control, highlighting the potential of glenzocimab to efficiently prevent thrombosis in the femoral ST model (**Figure 4C**). This observation was confirmed by a quantification showing a 72 % reduction in platelet signal (control: $671.1 \pm 109 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; glenzocimab: $184.6 \pm 26.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; $p = 0.0061$) (**Figure 4D**). These results indicate that glenzocimab efficiently prevents thrombosis in the femoral ST model, and could represent a novel therapeutic option in this indication.

CHAPTER 4: PRELIMINARY DISCUSSION

We developed and characterised a new *in vitro* macrofluidic model of ST, which contains its two determinants, *i.e.* the stent and the atherosclerotic plaque material. This model has the advantage to rely on chambers that can be easily adapted to the dimension and geometry of any human artery developing plaques, such as the carotid, the femoral or the coronary arteries. We provided evidence that different components of both carotid and femoral human atherosclerotic plaques homogenates become adsorbed on the chamber walls, such as type I and III collagen or oxidised lipids. We proved that combining both determinants of ST led to the formation of aggregates composed of tightly packed platelets, as observed by photonic and scanning electronic microscope. We observed that aspirin, the standard of care used to avert carotid ST, efficiently prevents thrombus formation in our flow device. Glencocimab was also very efficient under these experimental conditions. Similarly, we observed that DAPT and glencocimab were effective in the femoral ST model, with a slightly better effect of glencocimab.

We observed a reduction in thrombus formation of 90 % when whole blood was treated with aspirin, while glencocimab exhibited a similar significant reduction, even though it was slightly less effective as the inhibition only reached 82 %. One could therefore wonder whether there would be an advantage to replace aspirin with glencocimab in patients with tandem lesions. We propose that the huge advantage of glencocimab over aspirin comes from the fact that it is very safe, as evidence by clinical trials [22,24]. Therefore, using glencocimab in tandem lesion patients would achieve a very potent antithrombotic effect without carrying a bleeding risk. One could also propose that glencocimab should not replace aspirin, but be administered on top of aspirin to improve the antithrombotic potential with no harm to the patient. This hypothesis is supported by the fact that aspirin administered to glencocimab in

hGPVI mice does not increase the tail bleeding time when compared to aspirin (data not published). Moreover, the strategy consisting in treating patients with aspirin and glenzocimab will be evaluated in the setting of a clinical trial that aims to evaluate the benefit of such as strategy when compared to aspirin alone in tandem lesion patients.

Using the femoral ST model, we observed that glenzocimab (72 %) inhibits to a relatively similar extent thrombus formation compared to DAPT (61 %). However, we noticed that glenzocimab might appear less effective in the femoral ST model (72 % reduction in thrombus formation) when compared to the carotid ST model (82 % reduction in thrombus formation). This difference could be explained by a distinct reactivity of plaques between two vascular territories. Indeed, we have recently observed that plaque from different arteries present distinct reactivities, notably linked to their content in fibrillar collagen, which is the main ligand of GPVI (Feng *et al*, submitted). One could wonder whether the dose of glenzocimab should not be adapted depending on the clinical situation. Further experiments with an increased concentration of glenzocimab are needed.

While this model mimicking ST is innovative and combines both determinants to study this complication, it still has some limitations, and still requires to be improved. We used cryo-crushed human atherosclerotic plaque homogenates, which is the best approach today to mimic blood interaction with a diseased vessel. Nevertheless, we should keep in mind that the preparation of the plaque relies on cryo-crushing and steps of centrifugation, which are likely damaging or losing several plaque components. Another limitation of the model is the difficulty to reproduce the exact stiffness of a diseased vessel wall, as atherosclerotic plaque are extremely rigid. Therefore, it could be interesting to measure the stiffness of PDMS chambers to see how they compare with the vessels of interest and adapt the proportions for PDMS to approximate as closely as possible different pathological conditions in diverse

territories. Finally, even when the lumen is reopened in clinic, residual stenosis may still be present. It is well known that a narrowed lumen changes the rheological conditions of blood, which can influence thrombus formation. In order to be closest to the clinical conditions, we could develop a chamber with a mean residual stenosis found in the arteries of interest and coat HAPH on the narrowed part of the chamber.

This manuscript presents the characterisation of a new *in vitro* model to study ST that can be adapted to any vascular territory, based on 3D flow chambers. The combination of both determinants leading to ST induces the formation of thrombi in both the carotid and the femoral models. Aspirin and DAPT, the standard of care used to prevent respectively carotid and femoral ST, as well as glenzocimab, efficiently prevented thrombi formation in our flow model.

BIBLIOGRAPHY

1. Pop, R.; Zinchenko, I.; Quenardelle, V.; Mihoc, D.; Manisor, M.; Richter, J.S.; Severac, F.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Rouyer, O.; et al. Predictors and Clinical Impact of Delayed Stent Thrombosis after Thrombectomy for Acute Stroke with Tandem Lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* **2019**, *ajnr;ajnr.A5976v1*, doi:10.3174/ajnr.A5976.
2. Allard, J.; Delvoye, F.; Pop, R.; Labreuche, J.; Maier, B.; Marnat, G.; Sibon, I.; Zhu, F.; Lapergue, B.; Consoli, A.; et al. 24-Hour Carotid Stent Patency and Outcomes After Endovascular Therapy: A Multicenter Study. *Stroke* **2023**, *54*, 124–131, doi:10.1161/STROKEAHA.122.039797.
3. Watts, T.E.; Chatterjee, A.; Leeser, M.A. Stent Thrombosis: Early, Late, and Very Late. In *Cardiovascular Thrombus*; Academic Press, 2018; pp. 217–224 ISBN 978-0-12-812615-8.
4. Modi, K.; Soos, M.P.; Mahajan, K. *Stent Thrombosis*; StatPearls [Internet].; 2021;
5. Katsanos, K.; Al-Lamki, S.A.M.; Parthipun, A.; Spiliopoulos, S.; Patel, S.D.; Paraskevopoulos, I.; Zayed, H.; Diamantopoulos, A. Peripheral Stent Thrombosis Leading to Acute Limb Ischemia and Major Amputation: Incidence and Risk Factors in the Aortoiliac and Femoropopliteal Arteries. *Cardiovasc Intervent Radiol* **2017**, *40*, 351–359, doi:10.1007/s00270-016-1513-0.
6. Wenaweser, P.; Rey, C.; Eberli, F.R.; Togni, M.; Tüller, D.; Locher, S.; Remondino, A.; Seiler, C.; Hess, O.M.; Meier, B.; et al. Stent Thrombosis Following Bare-Metal Stent Implantation: Success of Emergency Percutaneous Coronary Intervention and Predictors of Adverse Outcome. *European Heart Journal* **2005**, *26*, 1180–1187, doi:10.1093/eurheartj/ehi135.
7. Cutlip, D.E.; Baim, D.S.; Ho, K.K.L.; Popma, J.J.; Lansky, A.J.; Cohen, D.J.; Carrozza, J.P.; Chauhan, M.S.; Rodriguez, O.; Kuntz, R.E. Stent Thrombosis in the Modern Era. *Circulation* **2001**, *103*, 1967–1971, doi:10.1161/01.cir.103.15.1967.
8. Pop, R.; Hasiu, A.; Mangin, P.H.; Severac, F.; Mihoc, D.; Nistoran, D.; Manisor, M.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Gheoca, R.; et al. Postprocedural Antiplatelet Treatment after Emergent Carotid Stenting in Tandem Lesions Stroke: Impact on Stent Patency beyond Day 1. *AJNR Am J Neuroradiol* **2021**, *42*, 921–925, doi:10.3174/ajnr.A6993.
9. Renú, A.; Blasco, J.; Laredo, C.; Llull, L.; Urrea, X.; Obach, V.; López-Rueda, A.; Rudilosso, S.; Zarco, F.; González, E.; et al. Carotid Stent Occlusion after Emergent Stenting in Acute Ischemic Stroke: Incidence, Predictors and Clinical Relevance. *Atherosclerosis* **2020**, *313*, 8–13, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.09.002.
10. Marnat, G.; Finistis, S.; Moreno, R.; Sibon, I.; Pop, R.; Mazighi, M.; Clarençon, F.; Rosso, C.; Dargazanli, C.; Darcourt, J.; et al. Aspirin versus Aggressive Antiplatelet Therapy for Acute Carotid Stenting plus Thrombectomy in Tandem Occlusions: ETIS Registry Results. *J NeuroIntervent Surg* **2022**, *jnis-2022-019527*, doi:10.1136/jnis-2022-019527.
11. Pop, R.; Severac, F.; Hasiu, A.; Mihoc, D.; Mangin, P.H.; Chibbaro, S.; Simu, M.; Tudor, R.; Gheoca, R.; Quenardelle, V.; et al. Conservative versus Aggressive Antiplatelet Strategy for Emergent Carotid Stenting during Stroke Thrombectomy. *Interv Neuroradiol* **2022**, *159101992210831*, doi:10.1177/15910199221083112.
12. Pop, R.; Burel, J.; Finitis, S.N.; Papagiannaki, C.; Severac, F.; Mangin, P.H.; Mihoc, D.; Leonard-Lorant, I.; Gheoca, R.; Wolff, V.; et al. Comparison of Three Antithrombotic Strategies for Emergent Carotid Stenting during Stroke Thrombectomy: A Multicenter Study. *J NeuroIntervent Surg* **2023**, *jnis-2022-019875*, doi:10.1136/jnis-2022-019875.
13. Ahmed, M.U.; Kaneva, V.; Loyau, S.; Nechipurenko, D.; Receveur, N.; Le Bris, M.; Janus-Bell, E.; Didelot, M.; Rauch, A.; Susen, S.; et al. Pharmacological Blockade of Glycoprotein VI Promotes Thrombus Disaggregation in the Absence of Thrombin. *ATVB* **2020**, *40*, 2127–2142, doi:10.1161/ATVBAHA.120.314301.
14. Mangin, P.; Yap, C.L.; Nonne, C.; Sturgeon, S.A.; Goncalves, I.; Yuan, Y.; Schoenwaelder, S.M.; Wright, C.E.; Lanza, F.; Jackson, S.P. Thrombin Overcomes the Thrombosis Defect Associated with Platelet GPVI/FcRγ Deficiency. *Blood* **2006**, *107*, 4346–4353, doi:10.1182/blood-2005-10-4244.
15. Jandrot-Perrus, M.; Hermans, C.; Mezzano, D. Platelet Glycoprotein VI Genetic Quantitative and Qualitative Defects. *Platelets* **2019**, *30*, 708–713, doi:10.1080/09537104.2019.1610166.

16. Kato, K.; Kanaji, T.; Russell, S.; Kunicki, T.J.; Furihata, K.; Kanaji, S.; Marchese, P.; Reininger, A.; Ruggeri, Z.M.; Ware, J. The Contribution of Glycoprotein VI to Stable Platelet Adhesion and Thrombus Formation Illustrated by Targeted Gene Deletion. *Blood* **2003**, *102*, 1701–1707, doi:10.1182/blood-2003-03-0717.
17. Lockyer, S.; Okuyama, K.; Begum, S.; Le, S.; Sun, B.; Watanabe, T.; Matsumoto, Y.; Yoshitake, M.; Kambayashi, J.; Tandon, N.N. GPVI-Deficient Mice Lack Collagen Responses and Are Protected against Experimentally Induced Pulmonary Thromboembolism. *Thrombosis Research* **2006**, *118*, 371–380, doi:10.1016/j.thromres.2005.08.001.
18. Hechler, B.; Gachet, C. Comparison of Two Murine Models of Thrombosis Induced by Atherosclerotic Plaque Injury. *Thromb Haemost* **2011**, *105*, S3–S12, doi:10.1160/THS10-11-0730.
19. Kuijpers, M.J.E.; Gilio, K.; Reitsma, S.; Nergiz-Unal, R.; Prinzen, L.; Heeneman, S.; Lutgens, E.; Van Zandvoort, M.A.M.J.; Nieswandt, B.; Oude Egbrink, M.G.A.; et al. Complementary Roles of Platelets and Coagulation in Thrombus Formation on Plaques Acutely Ruptured by Targeted Ultrasound Treatment: A Novel Intravital Model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 152–161, doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03186.x.
20. Alenazy, F.O.; Harbi, M.H.; Kavanagh, D.P.; Price, J.; Brady, P.; Hargreaves, O.; Harrison, P.; Slater, A.; Tiwari, A.; Nicolson, P.L.R.; et al. Amplified Inhibition of Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Glencocimab with Dual Antiplatelet Therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2023**, *21*, 3236–3251, doi:10.1016/j.jth.2023.07.018.
21. Lebozec, K.; Jandrot-Perrus, M.; Avenard, G.; Favre-Bulle, O.; Billiald, P. Design, Development and Characterization of ACT017, a Humanized Fab That Blocks Platelet's Glycoprotein VI Function without Causing Bleeding Risks. *mAbs* **2017**, *9*, 945–958, doi:10.1080/19420862.2017.1336592.
22. Billiald, P.; Slater, A.; Welin, M.; Clark, J.C.; Loyau, S.; Pugnière, M.; Jacomini, I.G.; Rose, N.; Lebozec, K.; Toledano, E.; et al. Targeting Platelet GPVI with Glencocimab: A Novel Mechanism for Inhibition. *Blood Advances* **2023**, *7*, 1258–1268, doi:10.1182/bloodadvances.2022007863.
23. Mangin, P.H.; Tang, C.; Bourdon, C.; Loyau, S.; Freund, M.; Hechler, B.; Gachet, C.; Jandrot-Perrus, M. A Humanized Glycoprotein VI (GPVI) Mouse Model to Assess the Antithrombotic Efficacies of Anti-GPVI Agents. *J Pharmacol Exp Ther* **2012**, *341*, 156–163, doi:10.1124/jpet.111.189050.
24. Voors-Pette, C.; Lebozec, K.; Dogterom, P.; Jullien, L.; Billiald, P.; Ferlan, P.; Renaud, L.; Favre-Bulle, O.; Avenard, G.; Machacek, M.; et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab: First-in-Human Healthy Volunteer Trial. *ATVB* **2019**, *39*, 956–964, doi:10.1161/ATVBaha.118.312314.
25. Renaud, L.; Lebozec, K.; Voors-Pette, C.; Dogterom, P.; Billiald, P.; Jandrot Perrus, M.; Pletan, Y.; Machacek, M. Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Glencocimab (ACT017) a Glycoprotein VI Inhibitor of Collagen-Induced Platelet Aggregation. *The Journal of Clinical Pharma* **2020**, *60*, 1198–1208, doi:10.1002/jcph.1616.
26. ESOC 2022 – Late Breaking Science, Ongoing Trials & Young Stroke Physicians and Researchers. *European Stroke Journal* **2022**, *7*, 574 (1758), doi:10.1177/23969873221094907.
27. Mazighi, M.; Köhrmann, M.; Lemmens, R.; Lyrer, P.A.; Molina, C.A.; Richard, S.; Toni, D.; Plétan, Y.; Sari, A.; Meilhoc, A.; et al. Safety and Efficacy of Platelet Glycoprotein VI Inhibition in Acute Ischaemic Stroke (ACTIMIS): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1b/2a Trial. *The Lancet Neurology* **2024**, *23*, 157–167, doi:10.1016/S1474-4422(23)00427-1.
28. Kern, A.Y.; Kreinin, Y.; Charle, L.; Epshteyn, M.; Korin, N.; Mangin, P.H. A Macrofluidic Model to Investigate the Intrinsic Thrombogenicity of Clinically Used Stents and Develop Less Thrombogenic Stents. *Heliyon* **2024**, e26550, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26550.
29. Karel, M.F.A.; Lemmens, T.P.; Tullemans, B.M.E.; Wielders, S.J.H.; Gubbins, E.; Van Beurden, D.; Van Rijt, S.; Cosmans, J.M.E.M. Characterization of Atherosclerotic Plaque Coating for Thrombosis Microfluidics Assays. *Cel. Mol. Bioeng.* **2022**, *15*, 55–65, doi:10.1007/s12195-021-00713-9.
30. Benetos, A.; Simon, A.; Levenson, J.; Lagneau, P.; Bouthier, J.; Safar, M. Pulsed Doppler: An Evaluation of Diameter, Blood Velocity and Blood Flow of the Common Carotid Artery in Patients with Isolated Unilateral Stenosis of the Internal Carotid Artery. *Stroke* **1985**, *16*, 969–972, doi:10.1161/01.STR.16.6.969.
31. Hussain, S.T.; Smith, R.E.; Wood, R.F.M.; Bland, M. Observer Variability in Volumetric Blood Flow Measurements in Leg Arteries Using Duplex Ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology* **1996**, *22*, 287–291.

32. Johnston, B.M.; Johnston, P.R.; Corney, S.; Kilpatrick, D. Non-Newtonian Blood Flow in Human Right Coronary Arteries: Steady State Simulations. *Journal of Biomechanics* **2004**, *37*, 709–720, doi:10.1016/j.jbiomech.2003.09.016.
33. Khoury, M.; Epshtein, M.; Zidan, H.; Zukerman, H.; Korin, N. Mapping Deposition of Particles in Reconstructed Models of Human Arteries. *Journal of Controlled Release* **2020**, *318*, 78–85, doi:10.1016/j.jconrel.2019.12.004.
34. Johari, N.H.; Hamady, M.; Xu, X.Y. A Computational Study of the Effect of Stent Design on Local Hemodynamic Factors at the Carotid Artery Bifurcation: *ARTRES* **2020**, *26*, 161, doi:10.2991/artres.k.200603.001.
35. Ohlmann, P.; Eckly, A.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Offermanns, S.; Gachet, C. ADP Induces Partial Platelet Aggregation without Shape Change and Potentiates Collagen-Induced Aggregation in the Absence of Gαq. *Blood* **2000**, *96*, 2134–2139, doi:10.1182/blood.V96.6.2134.
36. Tan, F.P.P.; Soloperto, G.; Bashford, S.; Wood, N.B.; Thom, S.; Hughes, A.; Xu, X.Y. Analysis of Flow Disturbance in a Stenosed Carotid Artery Bifurcation Using Two-Equation Transitional and Turbulence Models. *Journal of Biomechanical Engineering* **2008**, *130*, 061008, doi:10.1115/1.2978992.
37. Cisneros, J.A.; Newhouse, V.L.; Goldberg, B. Doppler Spectral Characterization of Flow Disturbances in the Carotid with the Doppler Probe at Right Angles to the Vessel Axis. *Ultrasound in Medicine & Biology* **1985**, *11*, 319–328, doi:10.1016/0301-5629(85)90131-0.
38. Jiang, Y.; Kohara, K.; Hiwada, K. Low Wall Shear Stress Contributes to Atherosclerosis of the Carotid Artery in Hypertensive Patients. *Hypertens Res* **1999**, *22*, 203–207, doi:10.1291/hypres.22.203.
39. Wu, S.P.; Ringgaard, S.; Oyre, S.; Hansen, M.S.; Rasmus, S.; Pedersen, E.M. Wall Shear Rates Differ between the Normal Carotid, Femoral, and Brachial Arteries: An in Vivo MRI Study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2004**, *19*, 188–193, doi:10.1002/jmri.10441.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Development and characterisation of the carotid ST model. (A) Carotid chamber at the human geometry with (left) and without (right) a stent. Scale bar: 10 mm. (B) Immunostaining of collagen I, collagen III and oxidized lipids on a coating of carotid atherosclerotic plaque homogenate. Control is the secondary antibody. Scale bar: 50 μm . (C) Computational fluid dynamics (CFD) simulations to characterize the bloodstream, flow stream and wall shear rate (WSR) inside the carotid artery chamber. (D) Internal carotid artery with or without a coating of plaque homogenate (16.5 mg of protein/mL wet weight) and a stent after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. (E) Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the internal carotid chamber (** $p = 0.0025$) ($n = 5$). Values are the mean \pm standard error of the mean. (I) Scanning electron microscopy (SEM) images of the lumen of a chamber with both determinants after one hour of blood perfusion. Scale bars: 20 μm .

Figure 2: Evaluation of the effect of glenzocimab compared to aspirin in the carotid ST model. (A) Internal carotid artery with or without aspirin (50 $\mu\text{g/mL}$) after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. (B) Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the internal carotid chamber (***) $p = 0.0003$) ($n = 5-6$). Values are the mean \pm standard error of the mean. (C) Internal carotid artery with or without glenzocimab (50 $\mu\text{g/mL}$) after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. (D) Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the internal carotid chamber (** $p = 0.0063$) ($n = 4$). Values are the mean \pm standard error of the mean.

Figure 3: Development and characterisation of the femoral ST model. (A) Femoral chamber at the human geometry with (left) and without (right) a stent. Scale bar: 10 mm. (B) Immunostaining of collagen I, collagen III and oxidized lipids on a coating of femoral atherosclerotic plaque homogenate. Control is the secondary antibody. Scale bar: 50 μm . (C)

Computational fluid dynamics (CFD) simulations to characterize the bloodstream, flow stream and wall shear rate (WSR) inside the superficial femoral artery chamber. **(D)** Femoral artery with or without a coating of plaque homogenate (16.5 mg of protein/mL wet weight) and a stent after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. **(E)** Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the femoral chamber (**** $p < 0.0001$) ($n = 3$). Values are the mean \pm standard error of the mean. **(I)** Scanning electron microscopy (SEM) images of a chamber with both determinants after one hour of blood perfusion. Scale bar: 20 μm .

Figure 4: Evaluation of the effect of glenzocimab compared to dual antiplatelet therapy in the femoral ST model. **(A)** Femoral artery with or without dual platelet anti-therapy (DAPT), combining aspirin (50 $\mu\text{g/mL}$) and cangrelor (0.45 $\mu\text{g/mL}$), after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. **(B)** Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the femoral chamber (** $p = 0.0021$) ($n = 3$). Values are the mean \pm standard error of the mean. **(C)** Femoral artery with or without glenzocimab (50 $\mu\text{g/mL}$) after one hour of perfusion of hirudinated human whole blood. Platelet aggregates appear in green. Scale bars: 2 mm. **(D)** Quantification of the surface area of platelet aggregates in the coated and stented zone of the femoral chamber (** $p = 0.0061$) ($n = 3$). Values are the mean \pm standard error of the mean.

Figure 1

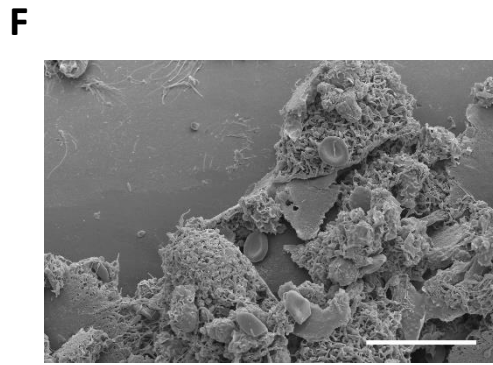
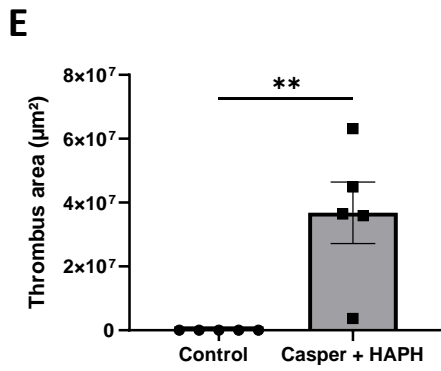
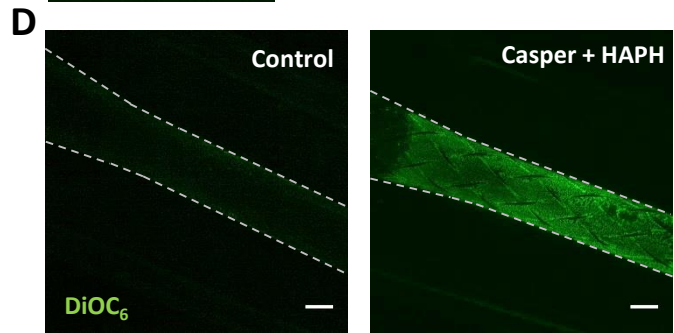
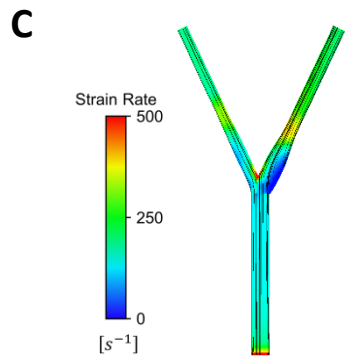
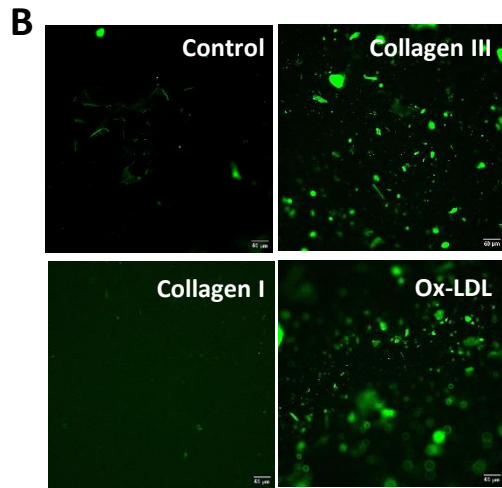
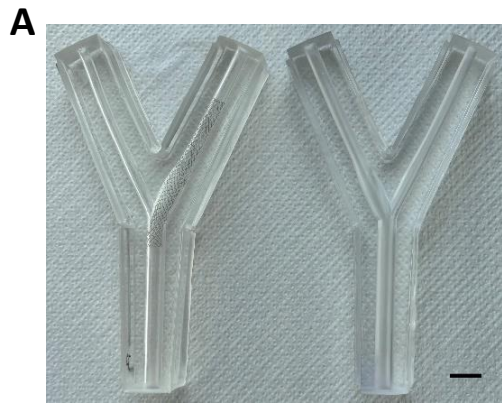


Figure 2

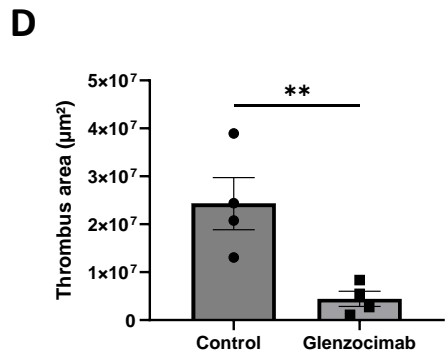
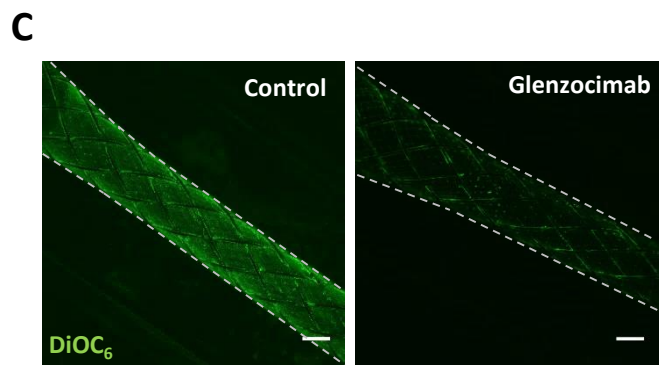
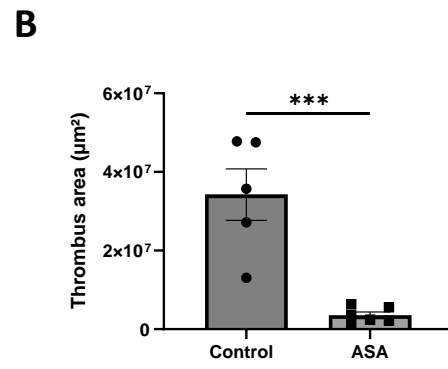
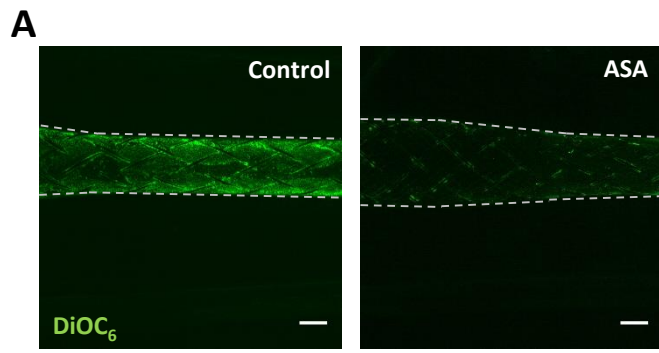


Figure 3

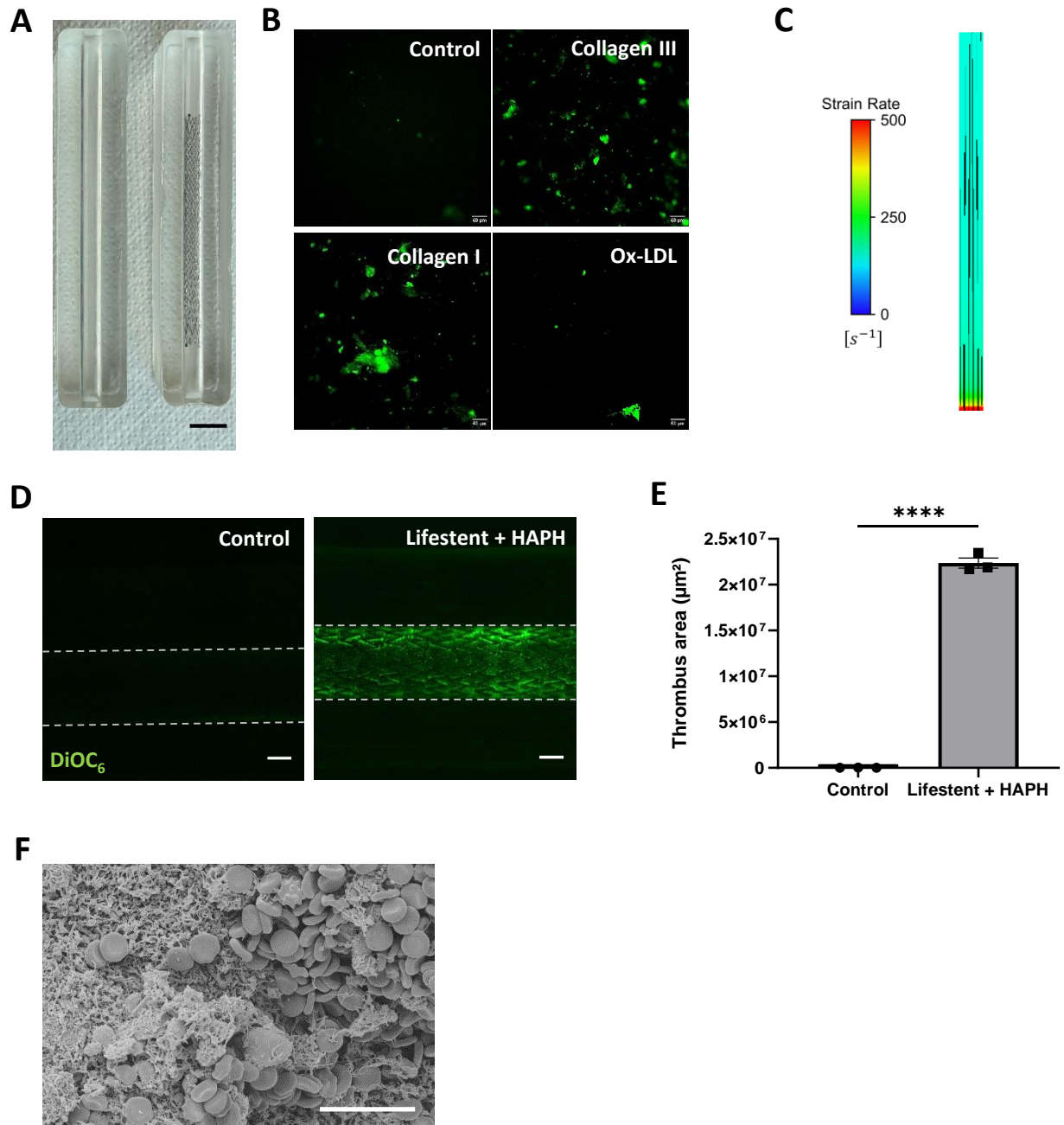
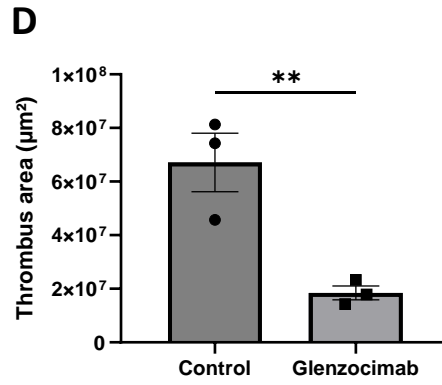
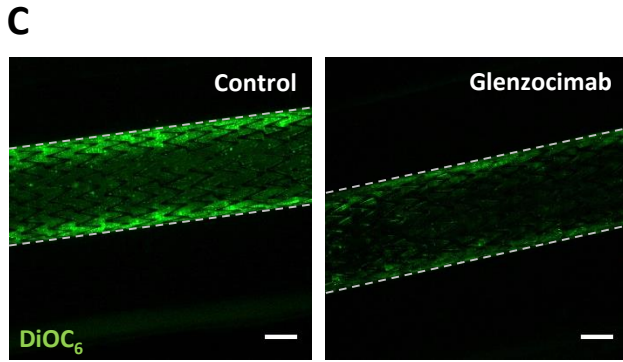
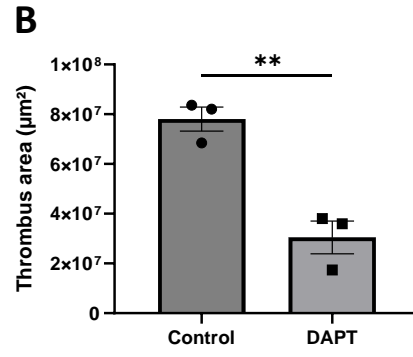
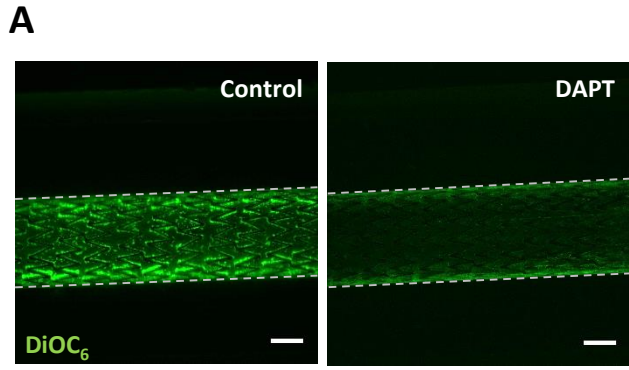


Figure 4



Conclusion

La mise au point du modèle *in vitro* de thrombose de stent a nécessité la combinaison de ses deux déterminants majeurs : le stent et la plaque d'athérosclérose. L'utilisation d'une plaque entière n'étant pas possible, nous avons préparé des homogénats broyés qui ont permis de recouvrir des surfaces d'intérêt dans les chambres de perfusion. L'immunofluorescence sur un coating d'homogénat de plaque indique que diverses protéines activatrices des plaquettes telles que les collagènes de type I et III, ou encore les lipides, s'adsorbent sur la paroi de la chambre. L'insertion d'un stent sur ce coating permet de reproduire *in vitro* une thrombose de stent. Les premiers résultats indiquent que le glenzocimab et l'aspirine inhibent de manière similaire la thrombose de stent carotidien. Il en est de même pour la bithérapie antiplaquettaire et le glenzocimab dans la thrombose de stent fémoral.

Ces résultats *in vitro* sont à confirmer *in vivo*. Nous développons actuellement un modèle de thrombose de stent dans la souris, ce qui a pour avantage d'être un modèle plus intégré et de donner des résultats potentiellement plus pertinents. Le glenzocimab ciblant la GPVI humaine, cela nécessite l'utilisation de souris hGPVI. Par ailleurs, les souris ne développant pas de plaque d'athérosclérose en temps normal, il faudra également utiliser des souris ApoE^{-/-} qui seront croisées avec la lignée hGPVI. Les résultats du manuscrit final devraient permettre de confirmer l'efficacité du glenzocimab en tant qu'agent antiplaquettaire dans la prévention de la thrombose de stent de divers territoires vasculaires et de constituer un socle scientifique solide pour lancer un essai clinique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'intérêt de l'étude des mécanismes menant à la thrombose de stent pour mieux la prévenir

Lors de la survenue d'une pathologie ischémique due à la rupture d'une plaque d'athérosclérose, les cliniciens peuvent installer un stent au niveau de l'artère malade pour rouvrir le vaisseau et restaurer un flux sanguin normal. Une complication peu courante, mais extrêmement grave de la pose d'un stent est la thrombose de stent. Pour la prévenir, la bithérapie antiplaquettaire est recommandée dans les artères coronaires et la fémorale, ce qui a permis d'en réduire son incidence à 0,7 % dans les coronaires et 6,1 % dans la fémorale, mais cette approche pharmacologique s'accompagne toujours d'un taux de mortalité très élevé qui oscille entre 10 et 40 % au niveau des coronaires. Au niveau cérébral, la prévention de la thrombose de stent repose sur une monothérapie d'aspirine afin de limiter le risque de saignement intracrânien, très délétère pour le patient. Cette stratégie thérapeutique a toutefois pour conséquence une incidence plus élevée de thrombose de stent, d'environ 20%, et peut mener jusqu'à la survenue d'un nouvel AVC ischémique ou au décès du patient. Comprendre par quels mécanismes la thrombose de stent survient et identifier de nouvelles cibles antiplaquettaires plus sûres est donc primordial.

L'objectif central de mon projet de thèse a été de déterminer les mécanismes mis en jeu dans la thrombose de stent afin de mieux la prévenir dans différents territoires vasculaires, à savoir la carotide, la fémorale et les coronaires. Les résultats obtenus sont : i) le développement d'une nouvelle plateforme macrofluidique permettant l'étude des stents carotidiens, fémoraux et coronaires utilisés en clinique et en cours de développement ; ii) l'identification et la caractérisation de l'importance du design du stent sur les modifications de l'écoulement sanguin et sur sa thrombogénicité ; iii) l'identification d'un potentiel effet protecteur des stents, lié à leur capacité à modifier localement le flux ; et iv) l'identification du glenzocimab, un agent anti-GPVI, comme un candidat-médicament intéressant pour prévenir la thrombose de stent sans risque de saignement pour les patients.

Développement d'un nouveau modèle macrofluidique permettant d'étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents et la thrombose de stent

Divers modèles expérimentaux (boucle de Chandler, système de perfusion Haemobile, chambre de perfusion annulaire, système de paillasse circulaire, modèle de perfusion *ex vivo*

par shunt artério-veineux carotide-jugulaire) permettant d'étudier la thrombogénicité des stents utilisés en clinique ont été développés et adaptés au cours des décennies. La revue que j'ai écrite à ce sujet [533] explique que ces modèles ont permis de définir les caractéristiques thrombogènes intrinsèques des stents, en particulier le matériau, ce qui a conduit au développement de stents composés de matériaux moins thrombogènes. Ces modèles de perfusion ont également contribué à l'essor des traitements de surface et de polymères recouvrant les stents pour réduire leur thrombogénicité. Ces modèles expérimentaux ont aussi contribué à montrer que la conception du stent est un autre facteur important de leur thrombogénicité. Toutefois, ces différents modèles présentent plusieurs limites. Tout d'abord, la plupart ne reproduisent pas les conditions physiologiques d'écoulement et les taux de cisaillement de la paroi, car les débits utilisés ne miment généralement pas les conditions rhéologiques des artères concernées. Or, le flux sanguin est un facteur très important de la fonction des plaquettes et de la coagulation, il est donc important d'essayer de reproduire le plus fidèlement possible les flux retrouvés chez les patients. De plus, l'insertion d'un stent dans un tube en plastique droit, lisse et semi-rigide ou dans une chambre de perfusion droite ne reproduit pas réellement la situation clinique. De même, ces modèles se sont uniquement concentrés sur l'étude de la thrombogénicité intrinsèque des stents coronaires et n'ont pas été utilisés pour tester des stents implantés dans d'autres artères, telles que la carotide ou la fémorale. Enfin, bien que ces modèles aient été importants pour identifier les caractéristiques thrombogènes des stents, ils n'ont pas étudié la thrombose de stent proprement dite, qui survient lorsqu'un stent est implanté sur une plaque d'athérosclérose dans un vaisseau malade.

Afin d'améliorer l'étude *in vitro* de la thrombose de stent, j'ai développé un modèle macrofluidique à l'échelle des vaisseaux humains pour étudier la thrombogénicité intrinsèque des stents utilisés en clinique, mais aussi la thrombose de stent. En collaboration avec une équipe de physiciens du Technion (Haïfa, Israël), j'ai mis au point au laboratoire un modèle permettant d'évaluer la thrombogénicité intrinsèque des stents cliniques en conditions de flux pertinents. Le modèle repose sur l'utilisation de chambres mimant la géométrie précise des artères coronaires, fémorales ou carotidiennes humaines. Il est parfaitement adapté à l'insertion d'un stent clinique en vue d'étudier son interaction avec les cellules sanguines. Par rapport aux modèles d'études des stents déjà développés, la chambre de perfusion permet la

mise en place d'un stent de manière similaire à ce qui se fait chez les patients. Ce positionnement pertinent du stent permet de reproduire les conditions rhéologiques rencontrées chez les patients, ce qui est d'une importance cruciale, car il est connu que la rhéologie est un régulateur clé de la fonction plaquettaire et un déclencheur majeur de la thrombose artérielle. La chambre est insérée dans un système de perfusion circulaire fermé permettant de perfuser du sang humain total hirudiné aux débits pertinents retrouvés dans les artères susmentionnées. L'importance de la rhéologie dans la thrombogénicité des stents et dans la thrombose de stent est ainsi mieux évaluée, puisqu'elle est un élément clé à considérer, car le flux est un déterminant majeur reconnu de la thrombose artérielle. Le modèle macrofluidique que nous avons développé présente de nombreux avantages, notamment le fait qu'il soit un modèle *in vitro* facilitant l'étude des dispositifs médicaux dont la taille nécessite généralement le recours aux grands animaux, ce qui va dans le sens de la réduction et du remplacement souhaités des animaux dans la recherche scientifique. De plus, grâce à sa grande taille, ce modèle macrofluidique est adapté à l'étude des dispositifs médicaux destinés à la clinique, ce qui n'est pas le cas des dispositifs microfluidiques largement utilisés par les laboratoires de recherche et les biotechs. La possibilité de perfuser du sang humain a également un intérêt majeur par rapport aux modèles animaux, car des différences d'espèces du système hémostatique existent entre l'homme et le cochon ou le mouton. Enfin, un modèle *in vitro* permet de contrôler précisément de nombreux paramètres afin d'obtenir des conditions similaires dans toutes les expériences. Cependant, ce système présente encore certaines limites dont les principales sont les volumes de sang et de réactifs nécessaires pour réaliser un flux (150 mL de sang) et l'utilisation d'une pompe péristaltique, qui produit un flux sanguin semi-constant au lieu d'un flux pulsatile. Un développement futur consisterait à utiliser une pompe pulsatile afin de mieux reproduire la dynamique des fluides dans les vaisseaux humains. Toutefois, cette étape reste un défi, car même dans les études microfluidiques, la pulsatilité n'est quasi jamais prise en compte en raison de difficultés techniques. Une autre limite du système est que les chambres ne reproduisent pas la rigidité précise d'un vaisseau sain ou malade. Il pourrait être intéressant de modifier la proportion des composants constituant la chambre ou d'utiliser d'autres matériaux ayant une rigidité différente afin d'étudier l'impact de la rigidité des vaisseaux sur la formation de thrombi sur les stents. De plus, l'utilisation de sang total hirudiné ne nous permet pas d'évaluer le rôle de

la coagulation dans la formation de thrombi sur les stents, car les conditions sont non coagulantes. L'utilisation d'un autre anticoagulant comme le citrate, permettrait de recalifier le sang total avant de le perfuser dans le dispositif. Cela représente un développement intéressant, mais cette adaptation sera particulièrement complexe, car la coagulation survient de manière rapide et explosive *in vitro* en raison du manque des inhibiteurs naturels et pourrait donc entraîner de nombreux artefacts.

Les stents carotidiens possèdent une thrombogénicité intrinsèque influencée par la rhéologie

Un résultat de mes travaux de thèse a été l'observation que les stents Casper et Wallstent sont tous deux thrombogènes. J'ai observé qu'ils permettent la formation d'un thrombus massif dans la bifurcation carotidienne, où les mailles du stent sont dans la lumière du vaisseau, ce qui a été corrélé avec des observations cliniques chez des patients victimes d'une thrombose de stent carotidien. Ces résultats soulignent l'importance du design du stent dans sa thrombogénicité intrinsèque. En effet, le design modifie le flux local autour des mailles du stent et génère une région à fort taux de cisaillement, hautement prothrombotique notamment par sa capacité à permettre le déploiement du FW. Par ailleurs, la formation de ce thrombus s'est avérée sensible à l'aspirine et aux antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ces observations sont en accord avec la pratique clinique, où l'aspirine est actuellement le traitement de référence pour prévenir la thrombose de stent carotidien [350,579,582]. Il convient toutefois de mentionner qu'environ 20 % des patients traités à l'aspirine développent toujours une thrombose de stent, et que des stratégies alternatives doivent être proposées. La raison pour laquelle l'aspirine semble être plus efficace dans notre modèle expérimental qu'en clinique n'est pas claire et pourrait être liée au fait que nous n'avons pas utilisé du sang de patients, mais de volontaires sains. Une autre explication potentielle vient du fait que, pour des raisons techniques, nous avons utilisé du sang anticoagulé. Il est possible qu'en présence de thrombine, le processus de thrombose de stent repose davantage sur la thrombine, une voie indépendante de la voie TxA2 ciblée par l'aspirine. L'efficacité des antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ n'est pas étonnante au regard de leur effet sur l'agrégation plaquettaire, dépendante de la liaison du fibrinogène plasmatique soluble à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$.

En plus du thrombus massif au niveau de la bifurcation, j'ai également observé que des thrombi plus petits se formaient sur les mailles du stent en contact avec la paroi de la chambre. En comparant les stents tressés Casper et Wallstent à un stent coupé au laser, le Protégé RX, j'ai observé que les stents Casper et Wallstent sont plus thrombogènes que les Protégé RX. Les zones de croisements des mailles des stents tressés sont les zones de formation privilégiées des thrombi, et coïncident avec une perturbation du flux sanguin, une zone de stagnation des plaquettes et une diminution des taux de cisaillement. Ce taux de cisaillement très bas pourrait permettre, par l'adsorption du fibrinogène plasmatique aux mailles du stent, l'adhérence des plaquettes par l'interaction fibrinogène- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, menant à leur activation puis agrégation. Ces observations ne sont pas retrouvées sur un stent coupé au laser, qui est moins thrombogène. Les matériaux utilisés pour fabriquer les implants médicaux sont connus pour déclencher une réponse biologique et représenter une source majeure d'effets secondaires indésirables. Il en est de même pour les matériaux composant les stents, qui favorisent l'adhérence et l'activation des plaquettes et encouragent la formation de thrombi. Nos résultats confirment que le nitinol et l'elgiloy, respectivement les matériaux du Casper et Wallstent, permettent l'agrégation des plaquettes, ce qui indique que ces deux matériaux sont thrombogènes par nature. Les thrombi formés se sont avérés sensibles aux antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, ce qui est peu surprenant puisqu'il s'agit de puissants inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. La formation des thrombi est également sensible à l'aspirine, ce qui est en accord avec la pratique clinique où l'aspirine est administrée en prévention d'une thrombose de stent, mais ne parvient à la prévenir que chez 80 % des patients. L'aspirine ne montre donc pas une efficacité complète dans la prévention de la thrombose de stent. Comme pour le thrombus massif à la bifurcation, il est possible que bloquer la voie du TxA2 ne soit pas suffisant et qu'inhiber d'autres voies soit nécessaire pour prévenir de manière optimale la thrombose de stent.

Évaluation du glenzocimab dans la prévention de la thrombose de stent

Une limite majeure des agents pharmacologiques utilisés en clinique pour prévenir la thrombose de stent est le risque de saignements importants qu'ils induisent. De nombreuses publications ont indiqué que la GPVI est une cible intéressante pour développer un nouvel agent antithrombotique plus sûr que les antiplaquettaires utilisés actuellement en clinique

[154,155,161,583]. Deux agents anti-GPVI ont été évalués dans des essais cliniques ces dernières années. Le premier est le revcept, une molécule composée de deux domaines extracellulaires de la GPVI reliés au fragment Fc d'un IgG formant une GPVI-Fc mimant la GPVI sous forme dimérique [377,584]. Le second est le glenzocimab, un fragment humanisé d'un anticorps monoclonal bloquant la GPVI. Ce dernier a montré une réduction de la thrombose expérimentale chez des souris humanisées pour la GPVI, ainsi que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène *ex vivo* sans réduire la numération plaquettaire ou induire d'effets secondaires hémorragiques chez le primate [158,585]. De même, dans un essai clinique de phase I chez des volontaires sains et un essai de phase Ib/IIa chez des patients atteints d'un AVC (NCT03803007), l'administration du glenzocimab n'a pas montré d'évènements indésirables majeurs, d'augmentation du temps de saignement, de modification de la numération et de l'expression plaquettaire de la GPVI [381,382]. Ce candidat-médicament est donc intéressant dans la prévention de la thrombose de stent.

Le troisième objectif de ma thèse a porté sur la mise en place d'un modèle de thrombose de stent qui permet l'évaluation de l'effet préventif du glenzocimab dans le modèle macrofluidique qui mime la carotide ou la fémorale. Les premiers résultats du projet montrent que la combinaison des deux déterminants de la thrombose de stent, à savoir le stent et la plaque d'athérosclérose, permet de reproduire *in vitro* la thrombose de stent. Le marquage de différents composants thrombogènes de l'homogénat de plaque d'athérosclérose indique que du collagène de type I, du collagène de type III et des lipides oxydés restent adhérents à la paroi de la chambre après coating. Il a été montré *in vitro* que l'aspirine et la bithérapie antiplaquettaire inhibent efficacement la formation de thrombi dans les modèles respectivement carotidien et fémoral. De même, le glenzocimab possède un effet antithrombotique puissant dans les deux modèles de thrombose de stent. Bien que proche de ce qu'il se passe chez les patients, le modèle *in vitro* de thrombose de stent possède quelques points à améliorer. Pour commencer, l'idéal pour mimer la plaque d'athérosclérose rompue serait d'insérer une plaque entière dans le vaisseau. Toutefois, cela n'est pas possible pour d'évidentes raisons techniques. Le recouvrement de la surface avec un homogénat de plaque est une alternative intéressante. Pour préparer les homogénats, nous avons opté pour une technique de cryobroyage. Cependant, le broyage endommage très probablement de nombreuses protéines activatrices des plaquettes, dont le collagène fibrillaire. De même, la préparation de l'homogénat repose sur une couche unique récupérée après centrifugation et

non pas sur la totalité de la préparation, ce qui peut faire perdre des facteurs thrombogènes de la plaque. Il est à noter que les homogénats utilisés sont obtenus à partir d'un pool de plaques de cinq patients pour limiter la variabilité interindividuelle. Une autre limite du modèle est l'utilisation de sang anticoagulé par de l'hirudine, un inhibiteur direct de la thrombine. Il pourrait être intéressant par la suite de faire intervenir la part de la coagulation dans la thrombose de stent. En effet, elle peut jouer un rôle substantiel chez les patients et il serait donc important de la prendre en compte. Un changement d'anticoagulant pour collecter le sang, comme le citrate, permet une recalcification ultérieure, et donc de réaliser des expériences dans lesquelles le système de coagulation est actif. Toutefois, cela représente un challenge majeur, car l'activation de la coagulation *in vitro* se fait de manière diffuse et exagérée, ce qui ne reflèterait pas le processus chez le patient qui resterait circonscrit au lieu du processus thrombotique.

Un effet protecteur des stents carotidiens sur du matériel thrombogène

Une observation surprenante et inattendue de ma thèse a été de constater une diminution de la thrombose lorsqu'un stent est implanté dans une chambre recouverte de matériel de plaque. En collaboration avec une équipe de mathématiciens (Amsterdam, Pays-Bas), nous avons comparé *in silico* l'influence de la structure du stent sur la répartition cellulaire et nous avons montré que les mailles des deux modèles de stent que l'on a utilisés, c'est-à-dire le Casper et le Wallstent, réduisent la disponibilité des plaquettes à proximité de la paroi du vaisseau. La résolution au niveau cellulaire des simulations révèle une influence significative des régions de recirculation des deux stents sur la disponibilité locale des plaquettes par rapport à une condition non stentée. Les résultats obtenus avec le Wallstent sont en accord avec d'autres travaux de la littérature, qui indiquent que les mailles du stent perturbent le flux et entraînent de larges régions de recirculation entre les mailles [419,434]. En revanche, le Casper est caractérisé par la survenue de zones de stagnation au niveau des grandes mailles externes du stent et par l'absence de régions de recirculation des globules rouges. Par ailleurs, le Casper entraîne une concentration plaquettaire plus élevée à proximité de la paroi du vaisseau que le Wallstent, ce qui pourrait favoriser la thrombogénicité intrinsèque des stents à double-couche et être associé à un risque plus élevé de complications thrombotiques. Ce résultat est en accord avec des études cliniques [446–448,586], et

indiquent que des différences même mineures dans l'environnement local influencent de manière importante les facteurs qui pourraient être liés à la thrombose de stent. Le modèle macrofluidique que l'on a développé pourrait être amélioré, notamment en intégrant soit au niveau *in vitro* ou *in silico* la pulsatilité et l'élasticité de la paroi du vaisseau. De plus, inclure des anomalies des vaisseaux malades spécifiques au patient, telles que le rétrécissement de la lumière ou la rigidité de la paroi du vaisseau, serait également intéressant. La perspective très intéressante de cette découverte est qu'elle ouvre la possibilité d'optimiser la conception des stents, en vue de créer des distributions cellulaires moins thrombogènes et, par conséquent, favorables pour le patient.

Limites de ce travail

Les données présentées dans ce travail de thèse, que ce soit pour l'évaluation de la thrombogénicité intrinsèque des stents ou l'étude de l'intérêt d'utiliser le glenzocimab dans la prévention de la thrombose de stent, ont été obtenues *in vitro* dans le modèle macrofluidique que j'ai mis en place au laboratoire. Bien qu'utiles à de nombreux égards, les chambres utilisées dans ce modèle ne reproduisent pas pour le moment la rigidité des vaisseaux et la déformation due à la sténose résiduelle de la plaque retrouvées chez les patients. De plus, bien que pertinent au vu des différences d'espèces qu'il peut y avoir, le sang humain utilisé est anticoagulé, donc seules les premières étapes de la formation de thrombi sont observables dans le système. Enfin, il faut noter que la pulsatilité n'est pas prise en compte et qu'il est important de considérer la variabilité interindividuelle. Ces éléments constituent des pistes d'amélioration du modèle macrofluidique. Nous envisageons également de mettre au point un modèle de thrombose de stent chez la souris.

Perspectives

Nos résultats montrent que le modèle macrofluidique est particulièrement bien adapté à l'évaluation de la thrombogénicité des stents utilisés en clinique. Ainsi, ce système pourrait représenter une plateforme attrayante pour évaluer différents paramètres thrombogènes des stents et cribler les nouveaux matériaux et design de stents en cours de développement. Enfin, ce modèle pourrait également contribuer à évaluer l'impact des traitements de surface ou de nouveaux coatings permettant de réduire la thrombogénicité intrinsèque des stents. Un tel dispositif constitue donc un modèle expérimental pertinent

susceptible d'intéresser les entreprises travaillant sur de nouveaux stents. Ce dispositif pourrait être utilisé dans le cadre de criblages précliniques avant des expériences sur de gros animaux comme les porcs et les moutons, et présente donc un avantage éthique évident. Le développement de stents moins thrombogènes permettrait d'adapter les stratégies thérapeutiques en utilisant des thérapies antiplaquettaires moins agressives et, par conséquent, de réduire les effets secondaires tels que les hémorragies. Nous avons déjà établi les premiers contacts avec des industriels allant dans ce sens.

Par ailleurs, les traitements antiplaquettaires prescrits pour prévenir la survenue d'une thrombose de stent ne sont pas toujours efficaces et possèdent un important risque hémorragique pouvant être fatal au patient. Un axe de mon travail a porté sur l'évaluation du glenzocimab, un agent anti-GPVI, dans la prévention de la thrombose de stent. Les premiers résultats *in vitro* indiquent que ce candidat-médicament serait tout aussi efficace que les traitements de référence utilisés en clinique dans deux territoires vasculaires différents, la carotide et la fémorale. Il serait intéressant de confirmer ces résultats *in vivo*. Pour cela, nous développons actuellement un modèle de thrombose de stent dans la souris, ce qui a pour avantage d'être un modèle plus intégré et de donner des résultats potentiellement plus pertinents. Afin de pouvoir étudier l'effet du glenzocimab dans la prévention de la thrombose de stent *in vivo*, le modèle murin devra exprimer la GPVI humaine, et nous disposons de ce type de souris au laboratoire (hGPVI). De plus, les souris devraient présenter des plaques d'athérosclérose. Pour cela, nous envisageons d'utiliser des souris ApoE^{-/-} qui pourraient être croisées avec la lignée hGPVI et utilisées à un stade auquel les souris présentent des plaques (un an). Les résultats issus de cette étude permettraient de confirmer l'efficacité du glenzocimab comme agent antiplaquettaire dans la prévention de la thrombose de stent et de lancer des études cliniques.

Conclusion

Pour conclure, mes travaux s'inscrivent dans une perspective globale de prévention de la thrombose de stent dans différents territoires vasculaires en caractérisant les mécanismes par lesquels les stents sont intrinsèquement thrombogènes, mais aussi en évaluant le potentiel du glenzocimab, un agent anti-GPVI, dans la prévention de la thrombose de stent. Le modèle macrofluidique développé au laboratoire permet l'étude des stents en cours de

développement dans leur globalité, mais aussi l'évaluation de chaque paramètre du stent (matériau, design, coating) séparément afin d'optimiser et de développer un stent le moins thrombogène possible. Enfin, il a été observé que le glenzocimab inhibe de manière similaire aux traitements de référence la thrombose de stent carotidien et fémoral. Bien que des études plus approfondies, notamment *in vivo*, soient à mener sur ce point, cela laisse paraître une chance de prévenir efficacement la thrombose de stent dans différents territoires vasculaires, sans risque de saignement pour les patients. Ce candidat-médicament est d'ailleurs actuellement inscrit dans un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) en cours aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, en collaboration avec le neuroradiologue Dr Raoul POP. Ce programme vise à évaluer l'efficacité du glenzocimab en complément de l'aspirine chez des patients victimes d'une lésion en tandem, c'est-à-dire dont l'AVC ischémique est provoqué par la rupture d'une plaque d'athérosclérose carotidienne, ce qui constitue un modèle de prévention de thrombose de stent carotidien.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mercadante, A.A.; Raja, A. *Anatomy, Arteries*; StatPearls [Internet].; 2023;
2. Waller, B.F.; Orr, C.M.; Slack, J.D.; Pinkerton, C.A.; Van Tassel, J.; Peters, T. Anatomy, Histology, and Pathology of Coronary Arteries: A Review Relevant to New Interventional and Imaging Techniques-Part I. *Clin Cardiol* **1992**, *15*, 451–457, doi:10.1002/clc.4960150613.
3. Mazurek, R.; Dave, J.M.; Chandran, R.R.; Misra, A.; Sheikh, A.Q.; Greif, D.M. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Advances in Pharmacology* **2017**, *78*, 323–350, doi:10.1016/bs.apha.2016.08.001.
4. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews* **2009**, *89*, 957–989, doi:10.1152/physrev.00041.2008.
5. Tucker, W.D.; Arora, Y.; Mahajan, K. *Anatomy, Blood Vessels*; StatPearls [Internet].; 08/23;
6. Fitzgerald, B.C.; Beaufrère, H. Cardiology. In *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*; Elsevier, 2016; pp. 252–328 ISBN 978-1-4557-4671-2.
7. Miller, L.M.; Gal, A. Cardiovascular System and Lymphatic Vessels. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*; Elsevier, 2017; pp. 561-616.e1 ISBN 978-0-323-35775-3.
8. Bou-Gharios, G.; Ponticos, M.; Rajkumar, V.; Abraham, D. Extra-Cellular Matrix in Vascular Networks. *Cell Prolif* **2004**, *37*, 207–220, doi:10.1111/j.1365-2184.2004.00306.x.
9. Leloup, A.J.A.; Van Hove, C.E.; Heykers, A.; Schrijvers, D.M.; De Meyer, G.R.Y.; Fransen, P. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca²⁺-Channels. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fphys.2015.00375.
10. Chiu, J.-J.; Chien, S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiological Reviews* **2011**, *91*, 327–387, doi:10.1152/physrev.00047.2009.
11. Krüger-Genge; Blocki; Franke; Jung Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *IJMS* **2019**, *20*, 4411, doi:10.3390/ijms20184411.
12. Boneu, B.; Cazenave, J.-P. *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*; 1ère édition.; Reims Boehringer Ingelheim, 1982;
13. Krug, S.M.; Schulzke, J.D.; Fromm, M. Tight Junction, Selective Permeability, and Related Diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2014**, *36*, 166–176, doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.002.
14. Morita, K.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Tsukita, S. Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCF Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* **1999**, *147*.
15. Vestweber, D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. *ATVB* **2008**, *28*, 223–232, doi:10.1161/ATVBAHA.107.158014.
16. Kramer, R.H.; Fuh, G.-M.; Karasek, M.A. Type IV Collagen Synthesis by Cultured Human Microvascular Endothelial Cells and Its Deposition into the Subendothelial Basement Membrane. *Biochemistry* **1985**, *24*, 7423–7430, doi:10.1021/bi00346a059.
17. Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W.; Nachman, R.L. Synthesis of von Willebrand Factor by Cultured Human Endothelial Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 1906–1909, doi:10.1073/pnas.71.5.1906.
18. Mandarino, L.J.; Sundarraj, N.; Finlayson, J.; Hassell, J.R. Regulation of Fibronectin and Laminin Synthesis by Retinal Capillary Endothelial Cells and Pericytes in Vitro. *Experimental Eye Research* **1993**, *57*, 609–621, doi:10.1006/exer.1993.1166.

19. Varga-Szabo, D.; Pleines, I.; Nieswandt, B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *ATVB* **2008**, *28*, 403–412, doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474.
20. Aird, W.C. Spatial and Temporal Dynamics of the Endothelium. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1392–1406, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01328.x.
21. Sagripanti, A.; Carpi, A. Antithrombotic and Prothrombotic Activities of the Vascular Endothelium. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2000**, *54*, 107–111, doi:10.1016/S0753-3322(00)88861-7.
22. Van Hinsbergh, V.W.M. Endothelium—Role in Regulation of Coagulation and Inflammation. *Semin Immunopathol* **2012**, *34*, 93–106, doi:10.1007/s00281-011-0285-5.
23. Garçon, L.; Delmer, A.; Maynadié, M. *Hématologie; Les référentiels des Collèges; 4ème.*; Elsevier Masson, 2021; ISBN 978-2-294-77155-2.
24. Loh, Y.; Tan, C.; Ch'ng, Y.; Yeap, Z.; Ng, C.; Yam, M. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *IJMS* **2018**, *19*, 120, doi:10.3390/ijms19010120.
25. Mellion, B.; Ignarro, L.; Ohlstein, E.; Pontecorvo, E.; Hyman, A.; Kadowitz, P. Evidence for the Inhibitory Role of Guanosine 3', 5'-Monophosphate in ADP-Induced Human Platelet Aggregation in the Presence of Nitric Oxide and Related Vasodilators. *Blood* **1981**, *57*, 946–955, doi:10.1182/blood.V57.5.946.946.
26. Bombeli, T.; Schwartz, B.R.; Harlan, J.M. Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-Dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Av β 3 Integrin, and GPIb α . *J Exp Med* **1998**, *187*, 329–339.
27. Kato, H. Regulation of Functions of Vascular Wall Cells by Tissue Factor Pathway Inhibitor: Basic and Clinical Aspects. *ATVB* **2002**, *22*, 539–548, doi:10.1161/01.ATV.0000013904.40673.CC.
28. Rosenberg, R.D. Biochemistry of Heparin Antithrombin Interactions, and the Physiologic Role of This Natural Anticoagulant Mechanism. *The American Journal of Medicine* **1989**, *87*, S2–S9, doi:10.1016/0002-9343(89)80523-6.
29. Suzuki, Y.; Yasui, H.; Brzoska, T.; Mogami, H.; Urano, T. Surface-Retained tPA Is Essential for Effective Fibrinolysis on Vascular Endothelial Cells. *Blood* **2011**, *118*, 3182–3185, doi:10.1182/blood-2011-05-353912.
30. Cleator, J.H.; Zhu, W.Q.; Vaughan, D.E.; Hamm, H.E. Differential Regulation of Endothelial Exocytosis of P-Selectin and von Willebrand Factor by Protease-Activated Receptors and cAMP. *Blood* **2006**, *107*, 2736–2744, doi:10.1182/blood-2004-07-2698.
31. Frenette, P.S.; Denis, C.V.; Weiss, L.; Jurk, K.; Subbarao, S.; Kehrel, B.; Hartwig, J.H.; Vestweber, D.; Wagner, D.D. P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (Psgl-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet–Endothelial Interactions in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **2000**, *191*, 1413–1422, doi:10.1084/jem.191.8.1413.
32. Arner, M.; Högestätt, E.D. Endothelium-Dependent Relaxation and Effects of Prostacyclin, Endothelin and Platelet-Activating Factor in Human Hand Veins and Arteries. *Acta Physiologica Scandinavica* **1991**, *142*, 165–172, doi:10.1111/j.1748-1716.1991.tb09144.x.
33. Moore, K.L.; Andreoli, S.P.; Esmon, N.L.; Esmon, C.T.; Bang, N.U. Endotoxin Enhances Tissue Factor and Suppresses Thrombomodulin Expression of Human Vascular Endothelium in Vitro. *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 124–130, doi:10.1172/JCI112772.
34. Handt, S.; Jerome, W.; Tietze, L.; Hantgan, R. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Secretion of Endothelial Cells Increases Fibrinolytic Resistance of an in Vitro Fibrin Clot: Evidence for a Key Role of Endothelial Cells in Thrombolytic Resistance. *Blood* **1996**, *87*, 4204–4213, doi:10.1182/blood.V87.10.4204.bloodjournal87104204.

35. Alexander, M.R.; Owens, G.K. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 13–40, doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142315.
36. Wanjare, M.; Agarwal, N.; Gerecht, S. Biomechanical Strain Induces Elastin and Collagen Production in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Vascular Smooth Muscle Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2015**, *309*, C271–C281, doi:10.1152/ajpcell.00366.2014.
37. Frismantiene, A.; Philippova, M.; Erne, P.; Resink, T.J. Smooth Muscle Cell-Driven Vascular Diseases and Molecular Mechanisms of VSMC Plasticity. *Cellular Signalling* **2018**, *52*, 48–64, doi:10.1016/j.cellsig.2018.08.019.
38. Schecter, A.D.; Spirn, B.; Rossikhina, M.; Giesen, P.L.A.; Bogdanov, V.; Fallon, J.T.; Fisher, E.A.; Schnapp, L.M.; Nemerson, Y.; Taubman, M.B. Release of Active Tissue Factor by Human Arterial Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* **2000**, *87*, 126–132, doi:10.1161/01.RES.87.2.126.
39. Mackman, N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *ATVB* **2004**, *24*, 1015–1022, doi:10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74.
40. Stenmark, K.R.; Yeager, M.E.; El Kasmi, K.C.; Nozik-Grayck, E.; Gerasimovskaya, E.V.; Li, M.; Riddle, S.R.; Frid, M.G. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 23–47, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
41. Shi, Y.; O'Brien, J.E.; Fard, A.; Mannion, J.D.; Wang, D.; Zalewski, A. Adventitial Myofibroblasts Contribute to Neointimal Formation in Injured Porcine Coronary Arteries. *Circulation* **1996**, *94*, 1655–1664, doi:https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.7.1655.
42. Enzerink, A.; Vaheri, A. Fibroblast Activation in Vascular Inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2011**, *9*, 619–626, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04209.x.
43. Theocharis, A.D.; Manou, D.; Karamanos, N.K. The Extracellular Matrix as a Multitasking Player in Disease. *The FEBS Journal* **2019**, *286*, 2830–2869, doi:10.1111/febs.14818.
44. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 786–801, doi:10.1038/nrm3904.
45. Kular, J.K.; Basu, S.; Sharma, R.I. The Extracellular Matrix: Structure, Composition, Age-Related Differences, Tools for Analysis and Applications for Tissue Engineering. *J Tissue Eng* **2014**, *5*, 204173141455711, doi:10.1177/2041731414557112.
46. Chistiakov, D.A.; Sobenin, I.A.; Orekhov, A.N. Vascular Extracellular Matrix in Atherosclerosis. *Cardiology in Review* **2013**, *21*, 270–288, doi:10.1097/CRD.0b013e31828c5ced.
47. Bergmeier, W.; Hynes, R.O. Extracellular Matrix Proteins in Hemostasis and Thrombosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2012**, *4*, a005132–a005132, doi:10.1101/cshperspect.a005132.
48. Rowe, R.G.; Weiss, S.J. Breaching the Basement Membrane: Who, When and How? *Trends in Cell Biology* **2008**, *18*, 560–574, doi:10.1016/j.tcb.2008.08.007.
49. LeBleu, V.S.; MacDonald, B.; Kalluri, R. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* **2007**, *232*, 1121–1129, doi:10.3181/0703-MR-72.
50. Kalluri, R. Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 422–433, doi:10.1038/nrc1094.
51. Aumailley, M.; Wiedemann, H.; Mann, K.; Timpl, R. Binding of Nidogen and the Laminin-Nidogen Complex to Basement Membrane Collagen Type IV. *Eur J Biochem* **1989**, *184*, 241–248, doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15013.x.
52. Kühn, K. Basement Membrane (Type IV) Collagen. *Matrix Biology* **1995**, *14*, 439–445, doi:10.1016/0945-053X(95)90001-2.

53. Grant, D.S.; Kibbey, M.C.; Kinsella, J.L.; Cid, M.C.; Kleinman, H.K. The Role of Basement Membrane in Angiogenesis and Tumor Growth. *Pathology - Research and Practice* **1994**, *190*, 854–863, doi:10.1016/S0344-0338(11)80989-1.
54. Grant, D.S.; Kleinman, H.K.; Martin, G.R. The Role of Basement Membranes in Vascular Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1990**, *588*, 61–72, doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb13197.x.
55. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, *3*, a004978–a004978, doi:10.1101/cshperspect.a004978.
56. Saelman, E.U.M.; Nieuwenhuis, K.; Hese, K.M.; De Groot, P.G.; Heijnen, H.F.G.; Sage, E.H.; Williams, S.B.; McKeown, L.P.; Gralnick, H.R.; Sixma, J.J. Platelet Adhesion to Collagen Types I Through VI11 Under Conditions of Stasis and Flow Is Mediated by GPIa/IIa (a2BI-Integrin). *Blood* **1994**, *83*, 1244–1250.
57. Manon-Jensen, T.; Kjeld, N.G.; Karsdal, M.A. Collagen-mediated Hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2016**, *14*, 438–448, doi:10.1111/jth.13249.
58. Wu, M.; Cronin, K.; Crane, J.S. *Biochemistry, Collagen Synthesis*; StatPearls [Internet].; 2022;
59. Jaffe, E.A.; Minick, C.R.; Adelman, B.; Becker, C.G.; Nachman, R. Synthesis of Basement Membrane Collagen by Cultured Human Endothelial Cells. *The Journal of experimental medicine* **1976**, *144*, 209–225, doi:10.1084/jem.144.1.209.
60. Jones, P.A.; Scott-Burden, T.; Gevers, W. Glycoprotein, Elastin, and Collagen Secretion by Rat Smooth Muscle Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 353–357, doi:10.1073/pnas.76.1.353.
61. Farndale, R.W.; Sixma, J.J.; Barnes, M.J.; De Groot, P.G. The Role of Collagen in Thrombosis and Hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2004**, *2*, 561–573, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00665.x.
62. Sorushanova, A.; Delgado, L.M.; Wu, Z.; Shologu, N.; Kshirsagar, A.; Raghunath, R.; Mullen, A.M.; Bayon, Y.; Pandit, A.; Raghunath, M.; et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials* **2019**, *31*, 1801651, doi:10.1002/adma.201801651.
63. Shoulders, M.D.; Raines, R.T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929–958, doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
64. Murata, K.; Motayama, T.; Kotake, C. Collagen Types in Various Layers of the Human Aorta and Their Changes with the Atherosclerotic Process. *Atherosclerosis* **1986**, *60*, 251–262, doi:10.1016/0021-9150(86)90172-3.
65. Xu, J.; Shi, G.-P. Vascular Wall Extracellular Matrix Proteins and Vascular Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2014**, *1842*, 2106–2119, doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.008.
66. Savage, B.; Almus-Jacobs, F.; Ruggeri, Z.M. Specific Synergy of Multiple Substrate–Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow. *Cell* **1998**, *94*, 657–666, doi:10.1016/S0092-8674(00)81607-4.
67. Knight, C.G.; Morton, L.F.; Peachey, A.R.; Tuckwell, D.S.; Farndale, R.W.; Barnes, M.J. The Collagen-Binding A-Domains of Integrins A1 β 1 and A2 β 1 Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-Helical) Collagens. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 35–40, doi:10.1074/jbc.275.1.35.
68. Sporn, L.A.; Chavin, S.I.; Marder, V.J.; Wagner, D.D. Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 1102–1106, doi:10.1172/JCI112064.

69. Wagner, D.D.; Marder, V.J. Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Endothelial Cells: Processing Steps and Their Intracellular Localization. *The Journal of cell biology* **1984**, *99*, 2123–2130, doi:10.1083/jcb.99.6.2123.
70. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand Factor, Platelets and Endothelial Cell Interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2003**, *1*, 1335–1342, doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x.
71. Furlan, M. Von Willebrand Factor: Molecular Size and Functional Activity. *Annals of Hematology* **1996**, *72*, 341–348, doi:10.1007/s002770050184.
72. Brehm, M. Von Willebrand Factor Processing. *Hamostaseologie* **2017**, *37*, 59–72, doi:10.5482/HAMO-16-06-0018.
73. Avdonin, P.P.; Tsvetaeva, N.V.; Goncharov, N.V.; Rybakova, E.Yu.; Trufanov, S.K.; Tsitrina, A.A.; Avdonin, P.V. Von Willebrand Factor in Health and Disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* **2021**, *15*, 201–218, doi:10.1134/S1990747821040036.
74. Savage, B.; Saldívar, E.; Ruggeri, Z.M. Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell* **1996**, *84*, 289–297, doi:10.1016/S0092-8674(00)80983-6.
75. Zhou, Y.-F.; Eng, E.T.; Zhu, J.; Lu, C.; Walz, T.; Springer, T.A. Sequence and Structure Relationships within von Willebrand Factor. *Blood* **2012**, *120*, 449–458, doi:10.1182/blood-2012-01-405134.
76. Leebeek, F.W.G.; Eikenboom, J.C.J. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* **2016**, *375*, 2067–2080, doi:10.1056/NEJMra1601561.
77. Siediecki, C.; Lestini, B.; Kottke-Marchant, K.; Eppell, S.; Wilson, D.; Marchant, R. Shear-Dependent Changes in the Three-Dimensional Structure of Human von Willebrand Factor. *Blood* **1996**, *88*, 2939–2950, doi:10.1182/blood.V88.8.2939.bloodjournal8882939.
78. Beumer, S.; Heijnen, H.; IJsseldijk, M.; Orlando, E.; De Groot, P.; Sixma, J. Platelet Adhesion to Fibronectin in Flow: The Importance of von Willebrand Factor and Glycoprotein Ib. *Blood* **1995**, *86*, 3452–3460, doi:10.1182/blood.V86.9.3452.bloodjournal8693452.
79. Hassan, Md.I.; Saxena, A.; Ahmad, F. Structure and Function of von Willebrand Factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* **2012**, *23*, 11–22, doi:10.1097/MBC.0b013e32834cb35d.
80. Kulkarni, S.; Dopheide, S.M.; Yap, C.L.; Ravanat, C.; Freund, M.; Mangin, P.; Heel, K.A.; Street, A.; Harper, I.S.; Lanza, F.; et al. A Revised Model of Platelet Aggregation. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 783–791, doi:10.1172/JCI7569.
81. Ruggeri, Z.M. The Role of von Willebrand Factor in Thrombus Formation. *Thrombosis Research* **2007**, *120*, S5–S9, doi:10.1016/j.thromres.2007.03.011.
82. Galbusera, M.; Noris, M.; Remuzzi, G. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura—Then and Now. *Semin Thromb Hemost* **2006**, *32*, 081–089, doi:10.1055/s-2006-939763.
83. Kaur, J.; Jain, A. *Fibrinogen*; StatPearls [Internet].; 2023;
84. Nurden, A.T. Molecular Basis of Clot Retraction and Its Role in Wound Healing. *Thrombosis Research* **2023**, *231*, 159–169, doi:10.1016/j.thromres.2022.08.010.
85. Polanowska-Grabowska, R.; Simon, C.; Gear, A. Platelet Adhesion to Collagen Type I, Collagen Type IV, von Willebrand Factor, Fibronectin, Laminin and Fibrinogen: Rapid Kinetics under Shear. *Thromb Haemost* **1999**, *81*, 118–123, doi:10.1055/s-0037-1614428.
86. Zaidi, T.N.; McIntire, L.V.; Farrell, D.H.; Thiagarajan, P. Adhesion of Platelets to Surface-Bound Fibrinogen Under Flow. *Blood* **1996**, *88*, 2267–2972.
87. Salsmann, A.; Schaffner-Reckinger, E.; Kieffer, N. RGD, the Rho'd to Cell Spreading. *European Journal of Cell Biology* **2006**, *85*, 249–254, doi:10.1016/j.ejcb.2005.08.003.
88. Kattula, S.; Byrnes, J.R.; Wolberg, A.S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *ATVB* **2017**, *37*, doi:10.1161/ATVBAHA.117.308564.

89. Kloczewiak, M.; Timmons, S.; Lukas, T.J.; Hawiger, J. Platelet Receptor Recognition Site on Human Fibrinogen. Synthesis and Structure-Function Relationship of Peptides Corresponding to the Carboxy-Terminal Segment of the γ Chain? *Biochemistry* **1984**, *23*, 1767–1774, doi:10.1021/bi00303a028.
90. Hawiger, J.; Kloczewiak, M.; Bednarek, M.A.; Timmons, S. Platelet Receptor Recognition Domains on the α Chain of Human Fibrinogen: Structure-Function Analysis. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2909–2914, doi:10.1021/bi00433a024.
91. Köhler, S.; Schmid, F.; Settanni, G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLoS Comput Biol* **2015**, *11*, e1004346, doi:10.1371/journal.pcbi.1004346.
92. Savage, B.; Ruggeri, Z.M. Selective Recognition of Adhesive Sites in Surface-Bound Fibrinogen by Glycoprotein IIb-IIIa on Nonactivated Platelets. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 11227–11233, doi:10.1016/S0021-9258(18)99152-0.
93. De Marco, L.; Girolami, A.; Zimmerman, T.S.; Ruggeri, Z.M. Von Willebrand Factor Interaction with the Glycoprotein IIb/IIIa Complex. Its Role in Platelet Function as Demonstrated in Patients with Congenital Afibrinogenemia. *J. Clin. Invest.* **1986**, *77*, 1272–1277, doi:10.1172/JCI112430.
94. Cho, J.; Mosher, D.F. Role of Fibronectin Assembly in Platelet Thrombus Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2006**, *4*, 1461–1469, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01943.x.
95. To, W.S.; Midwood, K.S. Plasma and Cellular Fibronectin: Distinct and Independent Functions during Tissue Repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* **2011**, *4*, 21, doi:10.1186/1755-1536-4-21.
96. Moretti, F.A.; Chauhan, A.K.; Iaconig, A.; Porro, F.; Baralle, F.E.; Muro, A.F. A Major Fraction of Fibronectin Present in the Extracellular Matrix of Tissues Is Plasma-Derived. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 28057–28062, doi:10.1074/jbc.M611315200.
97. Singh, P.; Carraher, C.; Schwarzbauer, J.E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 397–419, doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.
98. Schick, P.K.; Walker, J.; Profeta, B.; Denisova, L.; Bennett, V. Synthesis and Secretion of von Willebrand Factor and Fibronectin in Megakaryocytes at Different Phases of Maturation. *ATVB* **1997**, *17*, 797–801, doi:10.1161/01.ATV.17.4.797.
99. Tamkun, J.W.; Hynes, R.O. Plasma Fibronectin Is Synthesized and Secreted by Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 4641–4647, doi:10.1016/S0021-9258(18)32672-3.
100. Maurer, L.M.; Ma, W.; Mosher, D.F. Dynamic Structure of Plasma Fibronectin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2016**, *51*, 213–227, doi:10.1080/10409238.2016.1184224.
101. Dhanesha, N.; Ahmad, A.; Prakash, P.; Doddapattar, P.; Lentz, S.R.; Chauhan, A.K. Genetic Ablation of Extra Domain A of Fibronectin in Hypercholesterolemic Mice Improves Stroke Outcome by Reducing Thrombo-Inflammation. *Circulation* **2015**, *132*, 2237–2247, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016540.
102. Doddapattar, P.; Gandhi, C.; Prakash, P.; Dhanesha, N.; Grumbach, I.M.; Dailey, M.E.; Lentz, S.R.; Chauhan, A.K. Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4. *ATVB* **2015**, *35*, 2391–2400, doi:10.1161/ATVBAHA.115.306474.
103. Chorawala, M.; Prakash, P.; Doddapattar, P.; Jain, M.; Dhanesha, N.; Chauhan, A. Deletion of Extra Domain A of Fibronectin Reduces Acute Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Hyperlipidaemic Mice by Limiting Thrombo-Inflammation. *Thromb Haemost* **2018**, *118*, 1450–1460, doi:10.1055/s-0038-1661353.
104. Magnusson, M.K.; Mosher, D.F. Fibronectin: Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *ATVB* **1998**, *18*, 1363–1370, doi:10.1161/01.ATV.18.9.1363.

105. Gale, A.J. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol* **2011**, *39*, 273–280, doi:10.1177/0192623310389474.
106. Palta, S.; Saroa, R.; Palta, A. Overview of the Coagulation System. *Indian J Anaesth* **2014**, *58*, 515, doi:10.4103/0019-5049.144643.
107. Bearer, E.L.; Prakash, J.M.; Li, Z. Actin Dynamics in Platelets. *International Review of Cytology* **2002**, *217*, 137–182, doi:10.1016/S0074-7696(02)17014-8.
108. Quach, M.E.; Chen, W.; Li, R. Mechanisms of Platelet Clearance and Translation to Improve Platelet Storage. *Blood* **2018**, *131*, 1512–1521, doi:10.1182/blood-2017-08-743229.
109. Gremmel, T.; Frelinger, A.; Michelson, A. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* **2016**, *42*, 191–204, doi:10.1055/s-0035-1564835.
110. Escolar, G.; Leistikow, E.; White, J. The Fate of the Open Canalicular System in Surface and Suspension-Activated Platelets. *Blood* **1989**, *74*, 1983–1988, doi:10.1182/blood.V74.6.1983.1983.
111. White, J.G. The Submembrane Filaments of Blood Platelets. **1969**, *56*, 267–277.
112. Heijnen, H.; Van Der Sluijs, P. Platelet Secretory Behaviour: As Diverse as the Granules ... or Not? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2015**, *13*, 2141–2151, doi:10.1111/jth.13147.
113. Versteeg, H.H.; Heemskerk, J.W.M.; Levi, M.; Reitsma, P.H. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews* **2013**, *93*, 327–358, doi:10.1152/physrev.00016.2011.
114. Giuliano, S.; Nesbitt, W.S.; Rooney, M.; Jackson, S.P. Bidirectional Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Signalling Regulating Platelet Adhesion under Flow: Contribution of Protein Kinase C. *The Biochemical Journal* **2003**, *372*, 163–172.
115. Zahid, M.; Mangin, P.; Loyau, S.; Hechler, B.; Billiald, P.; Gachet, C.; Jandrot-Perrus, M. The Future of Glycoprotein VI as an Antithrombotic Target: *Glycoprotein VI as a Therapeutic Target*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2012**, *10*, 2418–2427, doi:10.1111/jth.12009.
116. Hickey, M.J.; Williams, S.A.; Roth, G.J. Human Platelet Glycoprotein IX: An Adhesive Prototype of Leucine-Rich Glycoproteins with Flank-Center-Flank Structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6773–6777, doi:10.1073/pnas.86.17.6773.
117. Lopez, J.A.; Chung, D.W.; Fujikawa, K.; Hagen, F.S.; Davie, E.W.; Roth, G.B. The α and F8 Chains of Human Platelet Glycoprotein Ib Are Both Transmembrane Proteins Containing a Leucine-Rich Amino Acid Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *84*, 2135–2139.
118. Modderman, P.W.; Admiraal, L.G.; Sonnenberg, A.; Von Dem Borne, A.E. Glycoproteins V and Ib-IX Form a Noncovalent Complex in the Platelet Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 364–369, doi:10.1016/S0021-9258(18)48503-1.
119. Phillips, D.R.; Agin, P.P. Platelet Plasma Membrane Glycoproteins. Evidence for the Presence of Nonequivalent Disulfide Bonds Using Nonreduced-Reduced Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 2121–2126, doi:10.1016/S0021-9258(18)71874-7.
120. Luo, S.-Z.; Mo, X.; Afshar-Kharghan, V.; Srinivasan, S.; López, J.A.; Li, R. Glycoprotein Ib α Forms Disulfide Bonds with 2 Glycoprotein Ib β Subunits in the Resting Platelet. *Blood* **2007**, *109*, 603–609, doi:10.1182/blood-2006-05-024091.
121. Bergmeier, W.; Piffath, C.L.; Goerge, T.; Cifuni, S.M.; Ruggeri, Z.M.; Ware, J.; Wagner, D.D. The Role of Platelet Adhesion Receptor GPIb α Far Exceeds That of Its Main Ligand, von Willebrand Factor, in Arterial Thrombosis. *PNAS* **2006**, *103*, 16900–16905.
122. Andrews, R.K.; Berndt, M.C. Platelet Adhesion: A Game of Catch and Release. *J. Clin. Invest.* **2008**, JCI36883, doi:10.1172/JCI36883.

123. Berndt, M.; Shen, Y.; Dopheide, S.; Gardiner, E.; Andrews, R. The Vascular Biology of the Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 178–188, doi:10.1055/s-0037-1616216.
124. Jurk, K.; Clemetson, K.J.; Groot, P.G.; Brodde, M.F.; Steiner, M.; Savion, N.; Varon, D.; Sixma, J.J.; Van Aken, H.; Kehrel, B.E. Thrombospondin-1 Mediates Platelet Adhesion at High Shear via Glycoprotein Ib (GPIb): An Alternative/Backup Mechanism to von Willebrand Factor. *FASEB j.* **2003**, *17*, 1–18, doi:10.1096/fj.02-0830fje.
125. Bradford, H.N.; Pixley, R.A.; Colman, R.W. Human Factor XII Binding to the Glycoprotein Ib-IX-V Complex Inhibits Thrombin-Induced Platelet Aggregation. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 22756–22763, doi:10.1074/jbc.M002591200.
126. Ozaki, Y.; Asazuma, N.; Suzuki-Inoue, K.; Berndt, M.C. Platelet GPIb-IX-V-dependent Signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1745–1751, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01379.x.
127. Mangin, P.; Yuan, Y.; Goncalves, I.; Eckly, A.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Gachet, C.; Jackson, S.P.; Lanza, F. Signaling Role for Phospholipase Cy2 in Platelet Glycoprotein Iba Calcium Flux and Cytoskeletal Reorganization. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 32880–32891, doi:10.1074/jbc.M302333200.
128. Strassel, C.; Eckly, A.; Leon, C.; Petitjean, C.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Gachet, C.; Lanza, F. Intrinsic Impaired Proplatelet Formation and Microtubule Coil Assembly of Megakaryocytes in a Mouse Model of Bernard-Soulier Syndrome. *Haematologica* **2009**, *94*, 800–810, doi:10.3324/haematol.2008.001032.
129. Liang, H.P.H.; Morel-Kopp, M.-C.; Clemetson, J.M.; Clemetson, K.J.; Kekomaki, R.; Kroll, H.; Michaelides, K.; Tuddenham, E.G.D.; Vanhoorelbeke, K.; Ward, C.M. A Common Ancestral Glycoprotein (GP) 9 1828A>G (Asn45Ser) Gene Mutation Occurring in European Families from Australia and Northern Europe with Bernard-Soulier Syndrome (BSS). *Thromb Haemost* **2005**, *94*, 599–605, doi:10.1160/TH05-03-0165.
130. Konstantinides, S.; Ware, J.; Marchese, P.; Almus-Jacobs, F.; Loskutoff, D.J.; Ruggeri, Z.M. Distinct Antithrombotic Consequences of Platelet Glycoprotein Iba and VI Deficiency in a Mouse Model of Arterial Thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2006**, *4*, 2014–2021, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02086.x.
131. Ni, H.; Denis, C.V.; Subbarao, S.; Degen, J.L.; Sato, T.N.; Hynes, R.O.; Wagner, D.D. Persistence of Platelet Thrombus Formation in Arterioles of Mice Lacking Both von Willebrand Factor and Fibrinogen. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 385–392, doi:10.1172/JCI9896.
132. Nieswandt, B.; Watson, S.P. Platelet-Collagen Interaction: Is GPVI the Central Receptor? *Blood* **2003**, *102*, 449–461, doi:10.1182/blood-2002-12-3882.
133. Best, D. GPVI Levels in Platelets: Relationship to Platelet Function at High Shear. *Blood* **2003**, *102*, 2811–2818, doi:10.1182/blood-2003-01-0231.
134. Jung, S.M.; Moroi, M.; Soejima, K.; Nakagaki, T.; Miura, Y.; Berndt, M.C.; Gardiner, E.E.; Howes, J.-M.; Pugh, N.; Bihan, D.; et al. Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 30000–30013, doi:10.1074/jbc.M112.359125.
135. Induruwa, I.; Moroi, M.; Bonna, A.; Malcor, J. -D.; Howes, J. -M.; Warburton, E.A.; Farndale, R.W.; Jung, S.M. Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI-dimer Recognizes Fibrinogen and Fibrin through Their D-domains, Contributing to Platelet Adhesion and Activation during Thrombus Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2018**, *16*, 389–404, doi:10.1111/jth.13919.
136. Jandrot-Perrus, M.; Busfield, S.; Lagrue, A.-H.; Xiong, X.; Debili, N.; Chickering, T.; Couedic, J.-P.L.; Goodearl, A.; Dussault, B.; Fraser, C.; et al. Cloning, Characterization, and Functional

- Studies of Human and Mouse Glycoprotein VI: A Platelet-Specific Collagen Receptor from the Immunoglobulin Superfamily. *Blood* **2000**, *96*, 1798–1807, doi:10.1182/blood.V96.5.1798.h8001798_1798_1807.
137. Mangin, P.H.; Onselaer, M.-B.; Receveur, N.; Le Lay, N.; Hardy, A.T.; Wilson, C.; Sanchez, X.; Loyau, S.; Dupuis, A.; Babar, A.K.; et al. Immobilized Fibrinogen Activates Human Platelets through Glycoprotein VI. *Haematologica* **2018**, *103*, 898–907, doi:10.3324/haematol.2017.182972.
 138. Nieswandt, B.; Brakebusch, C.; Bergmeier, W.; Schulte, V.; Bouvard, D.; Lindhout, T.; Heemskerk, J.W.M.; Zirngibl, H. Glycoprotein VI but Not A2b1 Integrin Is Essential for Platelet Interaction with Collagen. *The European Molecular Biology Organization Journal* **2001**, *20*, 2120–2130.
 139. Jarvis, G.E.; Raynal, N.; Langford, J.P.; Onley, D.J.; Andrews, A.; Smethurst, P.A.; Farndale, R.W. Identification of a Major GpVI-Binding Locus in Human Type III Collagen. *Blood* **2008**, *111*, 4986–4996, doi:10.1182/blood-2007-08-108472.
 140. Mammadova-Bach, E.; Ollivier, V.; Loyau, S.; Schaff, M.; Dumont, B.; Favier, R.; Freyburger, G.; Latger-Cannard, V.; Nieswandt, B.; Gachet, C.; et al. Platelet Glycoprotein VI Binds to Polymerized Fibrin and Promotes Thrombin Generation. *Blood* **2015**, *126*, 683–691, doi:10.1182/blood-2015-02-629717.
 141. Alshehri, O.M.; Hughes, C.E.; Montague, S.; Watson, S.K.; Frampton, J.; Bender, M.; Watson, S.P. Fibrin Activates GPVI in Human and Mouse Platelets. *Blood* **2015**, *126*, 1601–1608, doi:10.1182/blood-2015-04-641654.
 142. Berlanga, O.; Bori-Sanz, T.; James, J.R.; Frampton, J.; Davis, S.J.; Tomlinson, M.G.; Watson, S.P. Glycoprotein VI Oligomerization in Cell Lines and Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2007**, *5*, 1026–1033, doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02449.x.
 143. Suzuki-Inoue, K.; Tulasne, D.; Shen, Y.; Bori-Sanz, T.; Inoue, O.; Jung, S.M.; Moroi, M.; Andrews, R.K.; Berndt, M.C.; Watson, S.P. Association of Fyn and Lyn with the Proline-Rich Domain of Glycoprotein VI Regulates Intracellular Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 21561–21566, doi:10.1074/jbc.M201012200.
 144. Clemetson, J.M.; Polgar, J.; Magnenat, E.; Wells, T.N.C.; Clemetson, K.J. The Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily Closely Related to Fc α R and the Natural Killer Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29019–29024, doi:10.1074/jbc.274.41.29019.
 145. Zheng, Y.-M.; Liu, C.; Chen, H.; Locke, D.; Ryan, J.C.; Kahn, M.L. Expression of the Platelet Receptor GPVI Confers Signaling via the Fc Receptor γ -Chain in Response to the Snake Venom Convulxin but Not to Collagen. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 12999–13006, doi:10.1074/jbc.M009344200.
 146. Nieswandt, B.; Bergmeier, W.; Schulte, V.; Rackebrandt, K.; Gessner, J.E.; Zirngibl, H. Expression and Function of the Mouse Collagen Receptor Glycoprotein VI Is Strictly Dependent on Its Association with the FcR γ Chain. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 23998–24002, doi:10.1074/jbc.M003803200.
 147. Séverin, S.; Nash, C.A.; Mori, J.; Zhao, Y.; Abram, C.; Lowell, C.A.; Senis, Y.A.; Watson, S.P. Distinct and Overlapping Functional Roles of Src Family Kinases in Mouse Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2012**, *10*, 1631–1645, doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04814.x.
 148. Watson, S.P.; Auger, J.M.; McCARTY, O.J.T.; Pearce, A.C. GPVI and Integrin α IIb β 3 Signaling in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1752–1762, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01429.x.
 149. Quek, L.S.; Pasquet, J.-M.; Hers, I.; Cornall, R.; Knight, G.; Barnes, M.; Hibbs, M.L.; Dunn, A.R.; Lowell, C.A.; Watson, S.P. Fyn and Lyn Phosphorylate the Fc Receptor γ Chain Downstream of

- Glycoprotein VI in Murine Platelets, and Lyn Regulates a Novel Feedback Pathway. *Blood* **2000**, *96*, 4246–4253, doi:10.1182/blood.V96.13.4246.
150. Stegner, D.; Haining, E.J.; Nieswandt, B. Targeting Glycoprotein VI and the Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif Signaling Pathway. *ATVB* **2014**, *34*, 1615–1620, doi:10.1161/ATVBAHA.114.303408.
 151. Pasquet, J.-M.; Gross, B.; Quek, L.; Asazuma, N.; Zhang, W.; Sommers, C.L.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Judd, B.; Lee, J.R.; et al. LAT Is Required for Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C β 2 and Platelet Activation by the Collagen Receptor GPVI. *Molecular and Cellular Biology* **1999**, *19*, 8326–8334.
 152. Ahmed, M.U.; Kaneva, V.; Loyau, S.; Nechipurenko, D.; Receveur, N.; Le Bris, M.; Janus-Bell, E.; Didelot, M.; Rauch, A.; Susen, S.; et al. Pharmacological Blockade of Glycoprotein VI Promotes Thrombus Disaggregation in the Absence of Thrombin. *ATVB* **2020**, *40*, 2127–2142, doi:10.1161/ATVBAHA.120.314301.
 153. Rayes, J.; Watson, S.P.; Nieswandt, B. Functional Significance of the Platelet Immune Receptors GPVI and CLEC-2. *Journal of Clinical Investigation* **2019**, *129*, 12–23, doi:10.1172/JCI122955.
 154. Mangin, P.; Yap, C.L.; Nonne, C.; Sturgeon, S.A.; Goncalves, I.; Yuan, Y.; Schoenwaelder, S.M.; Wright, C.E.; Lanza, F.; Jackson, S.P. Thrombin Overcomes the Thrombosis Defect Associated with Platelet GPVI/Fc γ R Deficiency. *Blood* **2006**, *107*, 4346–4353, doi:10.1182/blood-2005-10-4244.
 155. Jandrot-Perrus, M.; Hermans, C.; Mezzano, D. Platelet Glycoprotein VI Genetic Quantitative and Qualitative Defects. *Platelets* **2019**, *30*, 708–713, doi:10.1080/09537104.2019.1610166.
 156. Kato, K.; Kanaji, T.; Russell, S.; Kunicki, T.J.; Furihata, K.; Kanaji, S.; Marchese, P.; Reininger, A.; Ruggeri, Z.M.; Ware, J. The Contribution of Glycoprotein VI to Stable Platelet Adhesion and Thrombus Formation Illustrated by Targeted Gene Deletion. *Blood* **2003**, *102*, 1701–1707, doi:10.1182/blood-2003-03-0717.
 157. Lockyer, S.; Okuyama, K.; Begum, S.; Le, S.; Sun, B.; Watanabe, T.; Matsumoto, Y.; Yoshitake, M.; Kambayashi, J.; Tandon, N.N. GPVI-Deficient Mice Lack Collagen Responses and Are Protected against Experimentally Induced Pulmonary Thromboembolism. *Thrombosis Research* **2006**, *118*, 371–380, doi:10.1016/j.thromres.2005.08.001.
 158. Mangin, P.H.; Tang, C.; Bourdon, C.; Loyau, S.; Freund, M.; Hechler, B.; Gachet, C.; Jandrot-Perrus, M. A Humanized Glycoprotein VI (GPVI) Mouse Model to Assess the Antithrombotic Efficacies of Anti-GPVI Agents. *J Pharmacol Exp Ther* **2012**, *341*, 156–163, doi:10.1124/jpet.111.189050.
 159. Cosemans, J.M.E.M.; Kuijpers, M.J.E.; Lecut, C.; Loubele, S.T.B.G.; Heeneman, S.; Jandrot-Perrus, M.; Heemskerk, J.W.M. Contribution of Platelet Glycoprotein VI to the Thrombogenic Effect of Collagens in Fibrous Atherosclerotic Lesions. *Atherosclerosis* **2005**, *181*, 19–27, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.037.
 160. Hechler, B.; Gachet, C. Comparison of Two Murine Models of Thrombosis Induced by Atherosclerotic Plaque Injury. *Thromb Haemost* **2011**, *105*, S3–S12, doi:10.1160/THS10-11-0730.
 161. Kuijpers, M.J.E.; Gilio, K.; Reitsma, S.; Nergiz-Unal, R.; Prinzen, L.; Heeneman, S.; Lutgens, E.; Van Zandvoort, M.A.M.J.; Nieswandt, B.; Oude Egbrink, M.G.A.; et al. Complementary Roles of Platelets and Coagulation in Thrombus Formation on Plaques Acutely Ruptured by Targeted Ultrasound Treatment: A Novel Intravital Model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 152–161, doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03186.x.
 162. Massberg, S.; Gawaz, M.; Grüner, S.; Schulte, V.; Konrad, I.; Zohlnhöfer, D.; Heinzmann, U.; Nieswandt, B. A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial

- Wall In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **2003**, *197*, 41–49, doi:10.1084/jem.20020945.
163. Bender, M.; Hagedorn, I.; Nieswandt, B. Genetic and Antibody-Induced Glycoprotein VI Deficiency Equally Protects Mice from Mechanically and FeCl₃-Induced Thrombosis: Letters to the Editor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2011**, *9*, 1423–1426, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04328.x.
164. Dubois, C.; Panicot-Dubois, L.; Merrill-Skoloff, G.; Furie, B.; Furie, B.C. Glycoprotein VI–Dependent and –Independent Pathways of Thrombus Formation in Vivo. *Blood* **2006**, *107*, 3902–3906, doi:10.1182/blood-2005-09-3687.
165. Humphries, J.D.; Byron, A.; Humphries, M.J. Integrin Ligands at a Glance. *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 3901–3903, doi:10.1242/jcs.03098.
166. Luo, B.-H.; Carman, C.V.; Springer, T.A. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual Review of Immunology* **2007**, *25*, 619–647.
167. Huang, J.; Li, X.; Shi, X.; Zhu, M.; Wang, J.; Huang, S.; Huang, X.; Wang, H.; Li, L.; Deng, H.; et al. Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: Signal Transduction, Regulation, and Its Therapeutic Targeting. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 26, doi:10.1186/s13045-019-0709-6.
168. Durrant, T.N.; Van Den Bosch, M.T.; Hers, I. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Outside-in Signaling. *Blood* **2017**, *130*, 1607–1619, doi:10.1182/blood-2017-03-773614.
169. Nieswandt, B.; Varga-Szabo, D.; Elvers, M. Integrins in Platelet Activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 206–209, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x.
170. Kinashi, T. Intracellular Signalling Controlling Integrin Activation in Lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 546–559, doi:10.1038/nri1646.
171. Janus-Bell, E.; Mangin, P.H. The Relative Importance of Platelet Integrins in Hemostasis, Thrombosis and Beyond. *haematol* **2023**, *108*, 1734–1747, doi:10.3324/haematol.2022.282136.
172. Takagi, J.; Petre, B.M.; Walz, T.; Springer, T.A. Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell* **2002**, *110*, 599–611, doi:10.1016/S0092-8674(02)00935-2.
173. Zutter, M.M.; Santoro, S.A. Widespread Histologic Distribution of the A₂ /1 Integrin Cell-Surface Collagen Receptor. *American Journal of Pathology* **1990**, *137*, 113–120.
174. Chen, J.; Diacovo, T.G.; Grenache, D.G.; Santoro, S.A.; Zutter, M.M. The A₂ Integrin Subunit-Deficient Mouse. *The American Journal of Pathology* **2002**, *161*, 337–344, doi:10.1016/S0002-9440(10)64185-5.
175. Habart, D.; Cheli, Y.; Nugent, D.J.; Ruggeri, Z.M.; Kunicki, T.J. Conditional Knockout of Integrin A₂β₁ in Murine Megakaryocytes Leads to Reduced Mean Platelet Volume. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55094, doi:10.1371/journal.pone.0055094.
176. Burkhart, J.M.; Vaudel, M.; Gambaryan, S.; Radau, S.; Walter, U.; Martens, L.; Geiger, J.; Sickmann, A.; Zahedi, R.P. The First Comprehensive and Quantitative Analysis of Human Platelet Protein Composition Allows the Comparative Analysis of Structural and Functional Pathways. *Blood* **2012**, *120*, e73–e82, doi:10.1182/blood-2012-04-416594.
177. Santoro, S.A.; Rajpara, S.M.; Staatz, W.D.; Woods, V.L. Isolation and Characterization of a Platelet Surface Collagen Binding Complex Related to VLA-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1988**, *153*, 217–223, doi:10.1016/S0006-291X(88)81211-7.
178. Sarratt, K.L.; Chen, H.; Zutter, M.M.; Santoro, S.A.; Hammer, D.A.; Kahn, M.L. GPVI and A₂β₁ Play Independent Critical Roles during Platelet Adhesion and Aggregate Formation to Collagen under Flow. *Blood* **2005**, *106*, 1268–1277, doi:10.1182/blood-2004-11-4434.

179. Vandenberg, P.; Kern, A.; Ries, A.; Luckenbill-Edds, L.; Mann, K.; Kiilm, K. Characterization of a Type IV Collagen Major Cell Binding Site with Affinity to the Cd/ I and the A2 1 Integrins. *The Journal of Cell Biology* **1991**, *113*, 1475–1483.
180. Emsley, J.; Knight, C.G.; Farndale, R.W.; Barnes, M.J.; Liddington, R.C. Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin A2b1. *Cell* **2000**, *101*, 47–56.
181. Ojalill, M.; Parikainen, M.; Rappu, P.; Aalto, E.; Jokinen, J.; Virtanen, N.; Siljamäki, E.; Heino, J. Integrin A2β1 Decelerates Proliferation, but Promotes Survival and Invasion of Prostate Cancer Cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 32435–32447, doi:10.18632/oncotarget.25945.
182. Inoue, O.; Suzuki-Inoue, K.; Dean, W.L.; Frampton, J.; Watson, S.P. Integrin A2β1 Mediates Outside-in Regulation of Platelet Spreading on Collagen through Activation of Src Kinases and PLCγ2. *The Journal of Cell Biology* **2003**, *160*, 769–780, doi:10.1083/jcb.200208043.
183. Nieuwenhuis, H.K.; Akkerman, J.W.N.; Houdijk, W.P.M.; Sixma, J.J. Human Blood Platelets Showing No Response to Collagen Fail to Express Surface Glycoprotein Ia. *Nature* **1985**, *318*, 470–472, doi:10.1038/318470a0.
184. Kehrel, B.; Balleisen, L.; Kokott, R.; Mesters, R.; Stenzinger, W.; Clemetson, K.; Van De Loo, J. Deficiency of Intact Thrombospondin and Membrane Glycoprotein Ia in Platelets with Defective Collagen-Induced Aggregation and Spontaneous Loss of Disorder. *Blood* **1988**, *71*, 1074–1078, doi:10.1182/blood.V71.4.1074.1074.
185. Holtkötter, O.; Nieswandt, B.; Smyth, N.; Müller, W.; Hafner, M.; Schulte, V.; Krieg, T.; Eckes, B. Integrin A2-Deficient Mice Develop Normally, Are Fertile, but Display Partially Defective Platelet Interaction with Collagen. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 10789–10794, doi:10.1074/jbc.M112307200.
186. He, L.; Pappan, L.K.; Grenache, D.G.; Li, Z.; Tollefsen, D.M.; Santoro, S.A.; Zutter, M.M. The Contributions of the A2β1 Integrin to Vascular Thrombosis in Vivo. *Blood* **2003**, *102*, 3652–3657, doi:10.1182/blood-2003-04-1323.
187. Wayner, E.A.; Carter, W.G.; Piotrowicz, R.S.; Kunicki, T.J. The Function of Multiple Extracellular Matrix Receptors in Mediating Cell Adhesion to Extracellular Matrix: Preparation of Monoclonal Antibodies to the Fibronectin Receptor That Specifically Inhibit Cell Adhesion to Fibronectin and React with Platelet Glycoproteins Ic-IIa. *The Journal of cell biology* **1988**, *107*, 1881–1891, doi:10.1083/jcb.107.5.1881.
188. Ni, H.; Freedman, J. Platelets in Hemostasis and Thrombosis: Role of Integrins and Their Ligands. *Transfusion and Apheresis Science* **2003**, *28*, 257–264, doi:10.1016/S1473-0502(03)00044-2.
189. Yang, S.; Woo, S.; Kim, D. Analysis of Atherosclerotic Plaque Distribution in the Carotid Artery. *Clinical Cardiology* **2022**, *45*, 1272–1276, doi:10.1002/clc.23903.
190. McCarty, O.J.T.; Zhao, Y.; Andrew, N.; Machesky, L.M.; Staunton, D.; Frampton, J.; Watson, S.P. Evaluation of the Role of Platelet Integrins in Fibronectin-dependent Spreading and Adhesion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2004**, *2*, 1823–1833, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00925.x.
191. Maurer, E.; Schaff, M.; Receveur, N.; Bourdon, C.; Mercier, L.; Nieswandt, B.; Dubois, C.; Jandrot-Perrus, M.; Goetz, J.G.; Lanza, F.; et al. Fibrillar Cellular Fibronectin Supports Efficient Platelet Aggregation and Procoagulant Activity. *Thromb Haemost* **2015**, *114*, 1175–1188, doi:10.1160/TH14-11-0958.
192. Francis, S.E.; Goh, K.L.; Hodivala-Dilke, K.; Bader, B.L.; Stark, M.; Davidson, D.; Hynes, R.O. Central Roles of A5β1 Integrin and Fibronectin in Vascular Development in Mouse Embryos and Embryoid Bodies. *ATVB* **2002**, *22*, 927–933, doi:10.1161/01.ATV.0000016045.93313.F2.
193. Yang, J.T.; Rayburn, H.; Hynes, R.O. Embryonic Mesodermal Defects in A5 Integrin-Deficient Mice. *Development* **1993**, *119*, 1093–1105.

194. Janus-Bell, E.; Yakusheva, A.; Scandola, C.; Receveur, N.; Ahmed, U.M.; Mouriaux, C.; Bourdon, C.; Loubière, C.; Eckly, A.; Senis, Y.A.; et al. Characterization of the Role of Integrin A5 β 1 in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis. *Thromb Haemost* **2022**, *122*, 767–776, doi:10.1055/a-1659-6214.
195. Soung, Y.H.; Chung, J. ITGA6 (Integrin, Alpha 6). *Atlas of genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* **2013**.
196. Geberhiwot, T.; Ingerpuu, S.; Pedraza, C.; Neira, M.; Lehto, U.; Virtanen, I.; Korttesmaa, J.; Tryggvason, K.; Engvall, E.; Patarroyo, M. Blood Platelets Contain and Secrete Laminin-8 (A4b1g1) and Adhere to Laminin-8 via A6b1 Integrin. *Experimental Cell Research* **1999**, *253*, 723–732.
197. Schaff, M.; Tang, C.; Maurer, E.; Bourdon, C.; Receveur, N.; Eckly, A.; Hechler, B.; Arnold, C.; De Arcangelis, A.; Nieswandt, B.; et al. Integrin A6 β 1 Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis. *Circulation* **2013**, *128*, 541–552, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000799.
198. Inoue, O.; Suzuki-Inoue, K.; McCarty, O.J.T.; Moroi, M.; Ruggeri, Z.M.; Kunicki, T.J.; Ozaki, Y.; Watson, S.P. Laminin Stimulates Spreading of Platelets through Integrin A6 β 1–Dependent Activation of GPVI. *Blood* **2006**, *107*, 1405–1412, doi:10.1182/blood-2005-06-2406.
199. Hindriks, G.; Ijsseldijk, M.; Sonnenberg, A.; Sixma, J.; De Groot, P. Platelet Adhesion to Laminin: Role of Ca²⁺ and Mg²⁺ Ions, Shear Rate, and Platelet Membrane Glycoproteins. *Blood* **1992**, *79*, 928–935, doi:10.1182/blood.V79.4.928.928.
200. Solh, M.; Solh, T.; Botsford, A. Glanzmann’s Thrombasthenia: Pathogenesis, Diagnosis, and Current and Emerging Treatment Options. *JBM* **2015**, *219*, doi:10.2147/JBM.S71319.
201. Grossi, I.M.; Hatfield, J.S.; Fitzgerald, L.A.; Newcombe, M.; Taylor, J.D.; Honn, K.V. Role of Tumor Cell Glycoproteins Immunologically Related to Glycoproteins Ib and IIb/IIIa in Tumor Cell-platelet and Tumor Cell-matrix Interactions. *FASEB j.* **1988**, *2*, 2385–2395, doi:10.1096/fasebj.2.8.2452113.
202. Jennings, L.K.; Phillips, D.R. Purification of Glycoproteins IIb and III from Human Platelet Plasma Membranes and Characterization of a Calcium-Dependent Glycoprotein IIb-III Complex. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 10458–10466, doi:10.1016/S0021-9258(18)34040-7.
203. Timar, J.; Trikha, M.; Szekeres, K.; Bazaz, R.; Honn, K. Expression and Function of the High Affinity. *Clinical & Experimental Metastasis* **1998**, *16*, 437–445.
204. Bennett, J.S. Structure and Function of the Platelet Integrin IIb 3. *Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115*, 3363–3369, doi:10.1172/JCI26989.
205. Wagner, C.; Mascelli, M.; Neblock, D.; Weisman, H.; Coller, B.; Jordan, R. Analysis of GPIIb/IIIa Receptor Number by Quantification of 7E3 Binding to Human Platelets. *Blood* **1996**, *88*, 907–914, doi:10.1182/blood.V88.3.907.907.
206. Springer, T.A.; Zhu, J.; Xiao, T. Structural Basis for Distinctive Recognition of Fibrinogen γ C Peptide by the Platelet Integrin α IIb β 3. *The Journal of Cell Biology* **2008**, *182*, 791–800, doi:10.1083/jcb.200801146.
207. Plow, E.F.; Haas, T.A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J.W. Ligand Binding to Integrins. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 21785–21788, doi:10.1074/jbc.R000003200.
208. Podolnikova, N.P.; Yakovlev, S.; Yakubenko, V.P.; Wang, X.; Gorkun, O.V.; Ugarova, T.P. The Interaction of Integrin α IIb β 3 with Fibrin Occurs through Multiple Binding Sites in the α IIb β -Propeller Domain. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 2371–2383, doi:10.1074/jbc.M113.518126.
209. Moake, J.L.; Turner, N.A.; Stathopoulos, N.A.; Nolasco, L.H.; Hellums, J.D. Involvement of Large Plasma von Willebrand Factor (vWF) Multimers and Unusually Large vWF Forms Derived from

- Endothelial Cells in Shear Stress-Induced Platelet Aggregation. *J. Clin. Invest.* **1986**, *78*, 1456–1461, doi:10.1172/JCI112736.
210. Moake, J.; Turner, N.; Stathopoulos, N.; Nolasco, L.; Hellums, J. Shear-Induced Platelet Aggregation Can Be Mediated by vWF Released from Platelets, as Well as by Exogenous Large or Unusually Large vWF Multimers, Requires Adenosine Diphosphate, and Is Resistant to Aspirin. *Blood* **1988**, *71*, 1366–1374, doi:10.1182/blood.V71.5.1366.1366.
211. Goschnick, M.W.; Lau, L.-M.; Wee, J.L.; Liu, Y.S.; Hogarth, P.M.; Robb, L.M.; Hickey, M.J.; Wright, M.D.; Jackson, D.E. Impaired “Outside-in” Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Signaling and Thrombus Stability in TSSC6-Deficient Mice. *Blood* **2006**, *108*, 1911–1918, doi:10.1182/blood-2006-02-004267.
212. Hodivala-Dilke, K.M.; McHugh, K.P.; Tsakiris, D.A.; Rayburn, H.; Crowley, D.; Ullman-Culleré, M.; Ross, F.P.; Coller, B.S.; Teitelbaum, S.; Hynes, R.O. B3-Integrin-Deficient Mice Are a Model for Glanzmann Thrombasthenia Showing Placental Defects and Reduced Survival. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 229–238, doi:10.1172/JCI5487.
213. Gurbel, P.A.; Kuliopulos, A.; Tantry, U.S. G-Protein-Coupled Receptors Signaling Pathways in New Antiplatelet Drug Development. *ATVB* **2015**, *35*, 500–512, doi:10.1161/ATVBAHA.114.303412.
214. Sun, B.; Li, J.; Okahara, K.; Kambayashi, J. P2X1 Purinoceptor in Human Platelets. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 11544–11547, doi:10.1074/jbc.273.19.11544.
215. Vial, C.; Rolf, M.G.; Mahaut-Smith, M.P.; Evans, R.J. A Study of P2X1 Receptor Function in Murine Megakaryocytes and Human Platelets Reveals Synergy with P2Y Receptors. *British J Pharmacology* **2002**, *135*, 363–372, doi:10.1038/sj.bjp.0704486.
216. Mahaut-Smith, M.P. The Unique Contribution of Ion Channels to Platelet and Megakaryocyte Function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2012**, *10*, 1722–1732, doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04837.x.
217. Toth-Zsamboki, E.; Oury, C.; Cornelissen, H.; De Vos, R.; Vermynen, J.; Hoylaerts, M.F. P2X1-Mediated ERK2 Activation Amplifies the Collagen-Induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 46661–46667, doi:10.1074/jbc.M308452200.
218. Mahaut-Smith, M.P.; Tolhurst, G.; Evans, R.J. Emerging Roles for P2X1 Receptors in Platelet Activation. *Platelets* **2004**, *15*, 131–144, doi:10.1080/09537100410001682788.
219. Erhardt, J.A.; Toomey, J.R.; Douglas, S.A.; Johns, D.G. P2X1 Stimulation Promotes Thrombin Receptor-mediated Platelet Aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2006**, *4*, 882–890, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01849.x.
220. Oury, C.; Toth-Zsamboki, E.; Thys, C.; Tytgat, J.; Vermynen, J.; Hoylaerts, M. The ATP-Gated P2X1 Ion Channel Acts as a Positive Regulator of Platelet Responses to Collagen. *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 1264–1271, doi:10.1055/s-0037-1616060.
221. Jones, S.; Evans, R.J.; Mahaut-Smith, M.P. Ca²⁺ Influx through P2X1 Receptors Amplifies P2Y₁ Receptor-Evoked Ca²⁺ Signaling and ADP-Evoked Platelet Aggregation. *Mol Pharmacol* **2014**, *86*, 243–251, doi:10.1124/mol.114.092528.
222. Hechler, B.; Lenain, N.; Marchese, P.; Vial, C.; Heim, V.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Cattaneo, M.; Ruggeri, Z.M.; Evans, R.; et al. A Role of the Fast ATP-Gated P2X1 Cation Channel in Thrombosis of Small Arteries In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **2003**, *198*, 661–667, doi:10.1084/jem.20030144.
223. Gachet, C. Regulation of Platelet Functions by P₂ Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 277–300, doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141207.
224. Hechler, B.; Magnenat, S.; Zighetti, M.L.; Kassack, M.U.; Ullmann, H.; Cazenave, J.-P.; Evans, R.; Cattaneo, M.; Gachet, C. Inhibition of Platelet Functions and Thrombosis through Selective or

- Nonselective Inhibition of the Platelet P2 Receptors with Increasing Doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(Imino-5,1,3-Benzenetriylbis-(Carbonylimino)))Tetrakis-Benzene-1,3-Disulfonic Acid Octasodium Salt]. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *314*, 232–243, doi:10.1124/jpet.105.084673.
225. Vassilatis, D.K.; Hohmann, J.G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J.E.; Mortrud, M.T.; Brown, A.; Rodriguez, S.S.; Weller, J.R.; Wright, A.C.; et al. The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 4903–4908, doi:10.1073/pnas.0230374100.
226. Offermanns, S. Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors. *Circulation Research* **2006**, *99*, 1293–1304, doi:10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
227. Smyth, S.S.; Woulfe, D.S.; Weitz, J.I.; Gachet, C.; Conley, P.B.; Goodman, S.G.; Roe, M.T.; Kuliopulos, A.; Moliterno, D.J.; French, P.A.; et al. G-Protein-Coupled Receptors as Signaling Targets for Antiplatelet Therapy. *ATVB* **2009**, *29*, 449–457, doi:10.1161/ATVBAHA.108.176388.
228. Gachet, C. P2 Receptors, Platelet Function and Pharmacological Implications. *Thromb Haemost* **2008**, *99*, 466–472, doi:10.1160/TH07-11-0673.
229. Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.-M.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Knight, G.E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 281–341, doi:10.1124/pr.58.3.3.
230. Léon, C.; Ravanat, C.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Gachet, C. Differential Involvement of the P2Y1 and P2Y12 Receptors in Platelet Procoagulant Activity. *ATVB* **2003**, *23*, 1941–1947, doi:10.1161/01.ATV.0000092127.16125.E6.
231. Léon, C.; Alex, M.; Klocke, A.; Morgenstern, E.; Moosbauer, C.; Eckly, A.; Spannagl, M.; Gachet, C.; Engelmann, B. Platelet ADP Receptors Contribute to the Initiation of Intravascular Coagulation. *Blood* **2004**, *103*, 594–600, doi:10.1182/blood-2003-05-1385.
232. Wong, P.C.; Watson, C.; Crain, E.J. The P2Y1 Receptor Antagonist MRS2500 Prevents Carotid Artery Thrombosis in Cynomolgus Monkeys. *J Thromb Thrombolysis* **2016**, *41*, 514–521, doi:10.1007/s11239-015-1302-7.
233. Hechler, B.; Nonne, C.; Roh, E.J.; Cattaneo, M.; Cazenave, J.-P.; Lanza, F.; Jacobson, K.A.; Gachet, C. MRS2500 [2-Iodo-N6-Methyl-(N)-Methanocarpa-2'-Deoxyadenosine-3',5'-Bisphosphate], a Potent, Selective, and Stable Antagonist of the Platelet P2Y1 Receptor with Strong Antithrombotic Activity in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *316*, 556–563, doi:10.1124/jpet.105.094037.
234. Léon, C.; Freund, M.; Ravanat, C.; Baurand, A.; Cazenave, J.-P.; Gachet, C. Key Role of the P2Y1 Receptor in Tissue Factor-Induced Thrombin-Dependent Acute Thromboembolism: Studies in P2Y1 -Knockout Mice and Mice Treated With a P2Y1 Antagonist. *Circulation* **2001**, *103*, 718–723, doi:10.1161/01.CIR.103.5.718.
235. Lenain, N.; Freund, M.; Léon, C.; Cazenave, J.-P.; Gachet, C. Inhibition of Localized Thrombosis in P2Y1-Deficient Mice and Rodents Treated with MRS2179, a P2Y1 Receptor Antagonist. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2003**, *1*, 1144–1149, doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00144.x.
236. Wihlborg, A.-K.; Wang, L.; Braun, O.Ö.; Eyjolfsson, A.; Gustafsson, R.; Gudbjartsson, T.; Erlinge, D. ADP Receptor P2Y12 Is Expressed in Vascular Smooth Muscle Cells and Stimulates Contraction in Human Blood Vessels. *ATVB* **2004**, *24*, 1810–1815, doi:10.1161/01.ATV.0000142376.30582.ed.
237. Wang, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Gao, Y.; Li, Y.; Jiang, Z.; Zhu, G.; Wang, X. Reproduction and Pathogenesis of Short Beak and Dwarfism Syndrome in Cherry Valley Pekin Ducks Infected with

- the Rescued Novel Goose Parvovirus. *Virulence* **2022**, *13*, 844–858, doi:10.1080/21505594.2022.2071184.
238. Ben Addi, A.; Cammarata, D.; Conley, P.B.; Boeynaems, J.-M.; Robaye, B. Role of the P2Y₁₂ Receptor in the Modulation of Murine Dendritic Cell Function by ADP. *The Journal of Immunology* **2010**, *185*, 5900–5906, doi:10.4049/jimmunol.0901799.
239. Ohlmann, P.; Eckly, A.; Freund, M.; Cazenave, J.-P.; Offermanns, S.; Gachet, C. ADP Induces Partial Platelet Aggregation without Shape Change and Potentiates Collagen-Induced Aggregation in the Absence of Gα_q. *Blood* **2000**, *96*, 2134–2139, doi:10.1182/blood.V96.6.2134.
240. Quinton, M. Cyclic Amp-Dependent Phosphorylation of the Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor Inhibits Ca²⁺ Release from Platelet Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, *184*, 893–899.
241. Tertyschnikova, S.; Fein, A. Inhibition of Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Ca²⁺ Release by cAMP-Dependent Protein Kinase in a Living Cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1613–1617, doi:10.1073/pnas.95.4.1613.
242. Cosemans, J.M.E.M.; Munnix, I.C.A.; Wetzker, R.; Heller, R.; Jackson, S.P.; Heemskerk, J.W.M. Continuous Signaling via PI3K Isoforms β and γ Is Required for Platelet ADP Receptor Function in Dynamic Thrombus Stabilization. *Blood* **2006**, *108*, 3045–3052, doi:10.1182/blood-2006-03-006338.
243. Schoenwaelder, S.M.; Ono, A.; Sturgeon, S.; Chan, S.M.; Mangin, P.; Maxwell, M.J.; Turnbull, S.; Mulchandani, M.; Anderson, K.; Kauffenstein, G.; et al. Identification of a Unique Co-Operative Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Mechanism Regulating Integrin αIIbβ₃ Adhesive Function in Platelets. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 28648–28658, doi:10.1074/jbc.M704358200.
244. Yi, W.; Li, Q.; Shen, J.; Ren, L.; Liu, X.; Wang, Q.; He, S.; Wu, Q.; Hu, H.; Mao, X.; et al. Modulation of Platelet Activation and Thrombus Formation Using a Pan-PI3K Inhibitor S14161. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102394, doi:10.1371/journal.pone.0102394.
245. Nurden, P.; Savi, P.; Heilmann, E.; Bihour, C.; Herbert, J.M.; Maffrand, J.P.; Nurden, A. An Inherited Bleeding Disorder Linked to a Defective Interaction between ADP and Its Receptor on Platelets. Its Influence on Glycoprotein IIb-IIIa Complex Function. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 1612–1622, doi:10.1172/JCI117835.
246. Remijn, J.A.; IJsseldijk, M.J.W.; Strunk, A.L.M.; Abbes, A.P.; Engel, H.; Dikkeschei, B.; Dompeling, E.C.; Groot, P.G.D.; Slingerland, R.J. Novel Molecular Defect in the Platelet ADP Receptor P2Y₁₂ of a Patient with Haemorrhagic Diathesis. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* **2007**, *45*, doi:10.1515/CCLM.2007.036.
247. Van Gestel, M.A.; Heemskerk, J.W.M.; Slaaf, D.W.; Heijnen, V.V.T.; Reneman, R.S.; Oude Egbrink, M.G.A. In Vivo Blockade of Platelet ADP Receptor P2Y₁₂ Reduces Embolus and Thrombus Formation but Not Thrombus Stability. *ATVB* **2003**, *23*, 518–523, doi:10.1161/01.ATV.0000057809.32354.22.
248. Conley, P.B.; Delaney, S.M. Scientific and Therapeutic Insights into the Role of the Platelet P2Y₁₂ Receptor in Thrombosis: *Current Opinion in Hematology* **2003**, *10*, 333–338, doi:10.1097/00062752-200309000-00002.
249. André, P.; Delaney, S.M.; LaRocca, T.; Vincent, D.; DeGuzman, F.; Jurek, M.; Koller, B.; Phillips, D.R.; Conley, P.B. P2Y₁₂ Regulates Platelet Adhesion/Activation, Thrombus Growth, and Thrombus Stability in Injured Arteries. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 398–406, doi:10.1172/JCI17864.
250. Hechler, B.; Gachet, C. P2 Receptors and Platelet Function. *Purinergic Signalling* **2011**, *7*, 293–303, doi:10.1007/s11302-011-9247-6.

251. Davì, G.; Santilli, F.; Vazzana, N. Thromboxane Receptors Antagonists and/or Synthase Inhibitors. In *Antiplatelet Agents*; Gresele, P., Born, G.V.R., Patrono, C., Page, C.P., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; Vol. 210, pp. 261–286 ISBN 978-3-642-29422-8.
252. Capra, V.; Bäck, M.; Angiolillo, D.J.; Cattaneo, M.; Sakariassen, K.S. Impact of Vascular Thromboxane Prostanoid Receptor Activation on Hemostasis, Thrombosis, Oxidative Stress, and Inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12*, 126–137, doi:10.1111/jth.12472.
253. Thomas, D.W.; Mannon, R.B.; Mannon, P.J.; Latour, A.; Oliver, J.A.; Hoffman, M.; Smithies, O.; Koller, B.H.; Coffman, T.M. Coagulation Defects and Altered Hemodynamic Responses in Mice Lacking Receptors for Thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 1994–2001, doi:10.1172/JCI5116.
254. Hamberg, M.; Svensson, J.; Samuelsson, B. Thromboxanes: A New Group of Biologically Active Compounds Derived from Prostaglandin Endoperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1975**.
255. Rucker, A.; Dhamoon, A.S. *Physiology, Thromboxane A₂*; StatPearls [Internet].; 2022;
256. Klages, B.; Brandt, U.; Simon, M.I.; Schultz, G.; Offermanns, S. Activation of G12/G13 Results in Shape Change and Rho/Rho-Kinase-Mediated Myosin Light Chain Phosphorylation in Mouse Platelets. *The Journal of Cell Biology* **1999**, *144*, 745–754, doi:10.1083/jcb.144.4.745.
257. Getz, T.M.; Dangelmaier, C.A.; Jin, J.; Daniel, J.L.; Kunapuli, S.P. Differential Phosphorylation of Myosin Light Chain (Thr)18 and (Ser)19 and Functional Implications in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2010**, *8*, 2283–2293, doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04000.x.
258. Defreyn, G.; Machin, S.J.; Carreras, L.O.; Dauden, M.V.; Chamone, D.A.F.; Vermynen, J. Familial Bleeding Tendency with Partial Platelet Thromboxane Synthetase Deficiency: Reorientation of Cyclic Endoperoxide Metabolism. *Br J Haematol* **1981**, *49*, 29–41, doi:10.1111/j.1365-2141.1981.tb07194.x.
259. Samama, M.; Lecrubier, C.; Conard, J.; Hotchen, M.; Breton-Gorius, J.; Vargaftig, B.; Chignard, M.; Lagarde, M.; Dechavanne, M. Constitutional Thrombocytopeny with Subnormal Response to Thromboxane A₂. *Br J Haematol* **1981**, *48*, 293–303, doi:10.1111/j.1365-2141.1981.tb02715.x.
260. Wu, K.K.; Le Breton, G.C.; Tai, H.H.; Chen, Y.C. Abnormal Platelet Response to Thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* **1981**, *67*, 1801–1804, doi:10.1172/JCI110221.
261. Grad, E.; Pachino, R.M.; FitzGerald, G.A.; Danenberg, H.D. Role of Thromboxane Receptor in C-Reactive Protein-Induced Thrombosis. *ATVB* **2012**, *32*, 2468–2474, doi:10.1161/ATVBAHA.112.256073.
262. O'Donnell, V.B.; Murphy, R.C.; Watson, S.P. Platelet Lipidomics: Modern Day Perspective on Lipid Discovery and Characterization in Platelets. *Circ Res* **2014**, *114*, 1185–1203, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301597.
263. Ossovskaya, V.S.; Bunnett, N.W. Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiological Reviews* **2004**, *84*, 579–621, doi:10.1152/physrev.00028.2003.
264. Leger, A.J.; Jacques, S.L.; Badar, J.; Kaneider, N.C.; Derian, C.K.; Andrade-Gordon, P.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Blocking the Protease-Activated Receptor 1-4 Heterodimer in Platelet-Mediated Thrombosis. *Circulation* **2006**, *113*, 1244–1254, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587758.
265. Heuberger, D.M.; Schuepbach, R.A. Protease-Activated Receptors (PARs): Mechanisms of Action and Potential Therapeutic Modulators in PAR-Driven Inflammatory Diseases. *Thrombosis J* **2019**, *17*, 4, doi:10.1186/s12959-019-0194-8.

266. Zeiler, M.; Moser, M.; Mann, M. Copy Number Analysis of the Murine Platelet Proteome Spanning the Complete Abundance Range. *Molecular & Cellular Proteomics* **2014**, *13*, 3435–3445, doi:10.1074/mcp.M114.038513.
267. Coughlin, S.R. Protease-activated Receptors in Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1800–1814, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x.
268. Woulfe, D.S. Platelet G Protein-Coupled Receptors in Hemostasis and Thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 2193–2200, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01338.x.
269. Voss, B.; McLaughlin, J.N.; Holinstat, M.; Zent, R.; Hamm, H.E. PAR1, but Not PAR4, Activates Human Platelets through a Gi /Phosphoinositide-3 Kinase Signaling Axis. *Mol Pharmacol* **2007**, *71*, 1399–1406, doi:10.1124/mol.106.033365.
270. Kim, S.; Foster, C.; Lecchi, A.; Quinton, T.M.; Prosser, D.M.; Jin, J.; Cattaneo, M.; Kunapuli, S.P. Protease-Activated Receptors 1 and 4 Do Not Stimulate Gi Signaling Pathways in the Absence of Secreted ADP and Cause Human Platelet Aggregation Independently of Gisignaling. *Blood* **2002**, *99*, 3629–3636, doi:10.1182/blood.V99.10.3629.
271. Vretenbrant, K.; Ramström, S.; Bjerke, M.; Lindahl, T. Platelet Activation via PAR4 Is Involved in the Initiation of Thrombin Generation and in Clot Elasticity Development. *Thromb Haemost* **2007**, *97*, 417–424, doi:10.1160/TH06-07-0397.
272. Kahn, M.L.; Nakanishi-Matsui, M.; Shapiro, M.J.; Ishihara, H.; Coughlin, S.R. Protease-Activated Receptors 1 and 4 Mediate Activation of Human Platelets by Thrombin. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 879–887, doi:10.1172/JCI6042.
273. Andersen, H.; Greenberg, D.L.; Fujikawa, K.; Xu, W.; Chung, D.W.; Davie, E.W. Protease-Activated Receptor 1 Is the Primary Mediator of Thrombin-Stimulated Platelet Procoagulant Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11189–11193, doi:10.1073/pnas.96.20.11189.
274. Weiss, E.J.; Hamilton, J.R.; Lease, K.E.; Coughlin, S.R. Protection against Thrombosis in Mice Lacking PAR3. *Blood* **2002**, *100*, 3240–3244, doi:10.1182/blood-2002-05-1470.
275. Hamilton, J.R.; Cornelissen, I.; Coughlin, S.R. Impaired Hemostasis and Protection against Thrombosis in Protease-activated Receptor 4-deficient Mice Is Due to Lack of Thrombin Signaling in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2004**, *2*, 1429–1435, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00783.x.
276. Sambrano, G.R.; Weiss, E.J.; Zheng, Y.-W.; Huang, W.; Coughlin, S.R. Role of Thrombin Signalling in Platelets in Haemostasis and Thrombosis. *Nature* **2001**, *413*, 74–78, doi:10.1038/35092573.
277. Vandendries, E.R.; Hamilton, J.R.; Coughlin, S.R.; Furie, B.; Furie, B.C. Par4 Is Required for Platelet Thrombus Propagation but Not Fibrin Generation in a Mouse Model of Thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 288–292, doi:10.1073/pnas.0610188104.
278. Kahn, M.L.; Zheng, Y.-W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S.; Farese, R.V.; Tam, C.; Coughlin, S.R. A Dual Thrombin Receptor System for Platelet Activation. *Nature* **1998**, *394*, 690–694, doi:10.1038/29325.
279. Kraft, W.; Gilmartin, J.; Chappell, D.; Gheyas, F.; Walker, B.; Nagalla, S.; Naik, U.; Horrow, J.; Wrishko, R.; Zhang, S.; et al. Effect of Vorapaxar Alone and in Combination with Aspirin on Bleeding Time and Platelet Aggregation in Healthy Adult Subjects. *Clinical Translational Sci* **2016**, *9*, 221–227, doi:10.1111/cts.12405.
280. Norris, L.A. Blood Coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2003**, *17*, 369–383, doi:10.1053/S1521-6934(03)00014-2.
281. Banner, D.W.; D’Arcy, A.; Chène, C.; Winkler, F.K.; Guha, A.; Konigsberg, W.H.; Nemerson, Y.; Kirchofer, D. The Crystal Structure of the Complex of Blood Coagulation Factor VIIa with Soluble Tissue Factor. *Nature* **1996**, *380*, 41–46, doi:10.1038/380041a0.

282. Butenas, S. Tissue Factor Structure and Function. *Scientifica* **2012**, 2012, 1–15, doi:10.6064/2012/964862.
283. Grover, S.P.; Mackman, N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *ATVB* **2018**, 38, 709–725, doi:10.1161/ATVBAHA.117.309846.
284. Drake, T.A.; Morrissey, J.H.; Edgington, T.S. Selective Cellular Expression of Tissue Factor in Human Tissues. **1989**, 134.
285. Wu, Y. Contact Pathway of Coagulation and Inflammation. *Thrombosis J* **2015**, 13, 17, doi:10.1186/s12959-015-0048-y.
286. Prottly, M.B.; Jenkins, P.V.; Collins, P.W.; O'Donnell, V.B. The Role of Procoagulant Phospholipids on the Surface of Circulating Blood Cells in Thrombosis and Haemostasis. *Open Biol* **2022**, 12, 210318, doi:10.1098/rsob.210318.
287. Smith, S.A.; Travers, R.J.; Morrissey, J.H. How It All Starts: Initiation of the Clotting Cascade. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2015**, 50, 326–336, doi:10.3109/10409238.2015.1050550.
288. Chaudhry, R.; Usama, S.M.; Babiker, H.M. *Physiology, Coagulation Pathways*; StatPearls [Internet].; 2022;
289. Cawthorn, K.M.; van, C.; DiLorenzo, M.E.; Branda, R.F.; Mann, K.G. Blood Coagulation in Hemophilia A and Hemophilia C. *Blood* **1998**, 91, 4581–4592.
290. Wolberg, A.S. Thrombin Generation and Fibrin Clot Structure. *Blood Reviews* **2007**, 21, 131–142, doi:10.1016/j.blre.2006.11.001.
291. Mann, K.G.; Nesheim, M.E.; Church, W.R.; Haley, P.; Krishnaswamy, S. Surface-Dependent Reactions of the Vitamin K-Dependent Enzyme Complexes. *Blood* **1990**, 76, 1–16.
292. Ilich, A.; Bokarev, I.; Key, N.S. Global Assays of Fibrinolysis. *Int J Lab Hematology* **2017**, 39, 441–447, doi:10.1111/ijlh.12688.
293. Mosesson, M.W. Fibrinogen and Fibrin Structure and Functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, 3, 1894–1904, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
294. Cesarman-Maus, G.; Hajjar, K.A. Molecular Mechanisms of Fibrinolysis. *Br J Haematol* **2005**, 129, 307–321, doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
295. Mackie, I.J.; Bull, H.A. Normal Haemostasis and Its Regulation. *Blood Reviews* **1989**, 3, 237–250, doi:10.1016/0268-960X(89)90031-3.
296. Chapin, J.C.; Hajjar, K.A. Fibrinolysis and the Control of Blood Coagulation. *Blood Reviews* **2015**, 29, 17–24, doi:10.1016/j.blre.2014.09.003.
297. Rijken, D.C.; Lijnen, H.R. New Insights into the Molecular Mechanisms of the Fibrinolytic System. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, 7, 4–13, doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x.
298. Keragala, C.B.; Medcalf, R.L. Plasminogen: An Enigmatic Zymogen. *Blood* **2021**, 137, 2881–2889, doi:10.1182/blood.2020008951.
299. Fasano, A.; Sequeira, A. Hemorheology and Hemodynamics. In *Hemomath*; MS&A; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 18, pp. 1–77 ISBN 978-3-319-60512-8.
300. Baskurt, O.K.; Meiselman, H.J. Blood Rheology and Hemodynamics. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS* **2003**, 29.
301. Valeanu, L.; Ginghina, C.; Bubenek-Turconi, S. Blood Rheology Alterations in Patients with Cardiovascular Diseases. *Rom J Anaesth Intensive Care* **2022**, 28, 41–46, doi:10.2478/rjaic-2021-0007.

302. Rezaeimoghaddam, M.; Van De Vosse, F.N. Continuum Modeling of Thrombus Formation and Growth under Different Shear Rates. *Journal of Biomechanics* **2022**, *132*, 110915, doi:10.1016/j.jbiomech.2021.110915.
303. Phillips, S.J. The Rheology of Blood. *J Extra Corpor Technol* **1972**, *4*, 46–50, doi:10.1051/ject/1972042046.
304. Ruggeri, Z.M. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation* **2009**, *16*, 58–83, doi:10.1080/10739680802651477.
305. Ranganath, N.K.; Rashidi, M.; Antaki, J.F.; Phillips, K.G.; Kon, Z.N.; Smith, D.E.; Reyentovich, A.; Moazami, N. Mechanical Blood-Immersed Bearings in Continuous-Flow Rotary Blood Pumps. *ASAIO Journal* **2020**, *66*, 343–347, doi:10.1097/MAT.0000000000000994.
306. Panteleev, M.A.; Korin, N.; Reesink, K.D.; Bark, D.L.; Cosemans, J.M.E.M.; Gardiner, E.E.; Mangin, P.H. Wall Shear Rates in Human and Mouse Arteries: Standardization of Hemodynamics for in Vitro Blood Flow Assays: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Biorheology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2021**, *19*, 588–595, doi:10.1111/jth.15174.
307. Nesbitt, W.S.; Mangin, P.; Salem, H.H.; Jackson, S.P. The Impact of Blood Rheology on the Molecular and Cellular Events Underlying Arterial Thrombosis. *J Mol Med* **2006**, *84*, 989–995, doi:10.1007/s00109-006-0101-1.
308. Kroll, M.H.; Hellums, J.D. Platelets and Shear Stress. *Blood* **1996**, *88*, 1525–1541, doi:10.1182/blood.V88.5.1525.1525.
309. Nash, G.B.; Watts, T.; Thornton, C.; Barigou, M. Red Cell Aggregation as a Factor Influencing Margination and Adhesion of Leukocytes and Platelets. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **2008**, *39*, 303–310, doi:10.3233/CH-2008-1109.
310. Müller, K.; Fedosov, D.A.; Gompper, G. Understanding Particle Margination in Blood Flow – A Step toward Optimized Drug Delivery Systems. *Medical Engineering & Physics* **2016**, *38*, 2–10, doi:10.1016/j.medengphy.2015.08.009.
311. Maxwell, M.J.; Westein, E.; Nesbitt, W.S.; Giuliano, S.; Dopheide, S.M.; Jackson, S.P. Identification of a 2-Stage Platelet Aggregation Process Mediating Shear-Dependent Thrombus Formation. *Blood* **2007**, *109*, 566–576, doi:10.1182/blood-2006-07-028282.
312. Jackson, S.P. The Growing Complexity of Platelet Aggregation. *Blood* **2007**, *109*, 5087–5095, doi:10.1182/blood-2006-12-027698.
313. Deng, W.; Xu, Y.; Chen, W.; Paul, D.S.; Syed, A.K.; Dragovich, M.A.; Liang, X.; Zakas, P.; Berndt, M.C.; Di Paola, J.; et al. Platelet Clearance via Shear-Induced Unfolding of a Membrane Mechanoreceptor. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12863, doi:10.1038/ncomms12863.
314. Chen, Y.; Ju, L.A.; Zhou, F.; Liao, J.; Xue, L.; Su, Q.P.; Jin, D.; Yuan, Y.; Lu, H.; Jackson, S.P.; et al. An Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Intermediate Affinity State Mediates Biomechanical Platelet Aggregation. *Nat. Mater.* **2019**, *18*, 760–769, doi:10.1038/s41563-019-0323-6.
315. Jackson, S.P.; Nesbitt, W.S.; Westein, E. Dynamics of Platelet Thrombus Formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 17–20, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x.
316. Gay, M.; Zhang, L.T. Numerical Studies of Blood Flow in Healthy, Stenosed, and Stented Carotid Arteries. *Numerical Methods in Fluids* **2009**, *61*, 453–472, doi:10.1002/flid.1966.
317. Siegel, J.M.; Markou, C.P.; Ku, D.N.; Hanson, S.R. A Scaling Law for Wall Shear Rate Through an Arterial Stenosis. *Journal of Biomechanical Engineering* **1994**, *116*, 446–451, doi:10.1115/1.2895795.
318. Bark, D.L.; Ku, D.N. Wall Shear over High Degree Stenoses Pertinent to Atherothrombosis. *Journal of Biomechanics* **2010**, *43*, 2970–2977, doi:10.1016/j.jbiomech.2010.07.011.

319. Nesbitt, W.S.; Westein, E.; Tovar-Lopez, F.J.; Tolouei, E.; Mitchell, A.; Fu, J.; Carberry, J.; Fouras, A.; Jackson, S.P. A Shear Gradient–Dependent Platelet Aggregation Mechanism Drives Thrombus Formation. *Nat Med* **2009**, *15*, 665–673, doi:10.1038/nm.1955.
320. Wang, Y.; Zhan, J.; Bian, W.; Tang, X.; Zeng, M. Local Hemodynamic Analysis after Coronary Stent Implantation Based on Euler-Lagrange Method. *J Biol Phys* **2021**, *47*, 143–170, doi:10.1007/s10867-021-09571-y.
321. Jiménez, J.M.; Davies, P.F. Hemodynamically Driven Stent Strut Design. *Ann Biomed Eng* **2009**, *37*, 1483, doi:10.1007/s10439-009-9719-9.
322. McFadyen, J.D.; Jackson, S.P. Differentiating Haemostasis from Thrombosis for Therapeutic Benefit. *Thromb Haemost* **2013**, *110*, 859–867, doi:10.1160/TH13-05-0379.
323. Badimon, L.; Vilahur, G. Thrombosis Formation on Atherosclerotic Lesions and Plaque Rupture. *J Intern Med* **2014**, *276*, 618–632, doi:10.1111/joim.12296.
324. Van Zanten, G.H.; De Graaf, S.; Slootweg, P.J.; Heijnen, H.F.; Connolly, T.M.; De Groot, P.G.; Sixma, J.J. Increased Platelet Deposition on Atherosclerotic Coronary Arteries. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 615–632, doi:10.1172/JCI117014.
325. Tendra, M.; Aboyans, V.; Bartelink, M.-L.; Baumgartner, I.; Clément, D.; Collet, J.-P.; Cremonesi, A.; De Carlo, M.; Erbel, R.; Fowkes, F.G.R.; et al. ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* **2012**, *65*, 172, doi:10.1016/j.rec.2011.11.007.
326. Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis. **2002**, *420*.
327. Mackman, N. Triggers, Targets and Treatments for Thrombosis. *Nature* **2008**, *451*, 914–918, doi:10.1038/nature06797.
328. Kolodgie, F.D.; Nakazawa, G.; Sangiorgi, G.; Ladich, E.; Burke, A.P.; Virmani, R. Pathology of Atherosclerosis and Stenting. *Neuroimaging Clinics of North America* **2007**, *17*, 285–301, doi:10.1016/j.nic.2007.03.006.
329. Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis. **2011**, *9*.
330. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, 233–241, doi:10.1038/35025203.
331. Sakakura, K.; Nakano, M.; Otsuka, F.; Ladich, E.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart, Lung and Circulation* **2013**, *22*, 399–411, doi:10.1016/j.hlc.2013.03.001.
332. Gimbrone, M.A.; García-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **2016**, *118*, 620–636, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
333. Lo, J.; Plutzky, J. The Biology of Atherosclerosis: General Paradigms and Distinct Pathogenic Mechanisms Among HIV-Infected Patients. *The Journal of Infectious Diseases* **2012**, *205*, S368–S374, doi:10.1093/infdis/jis201.
334. Galkina, E.; Ley, K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *ATVB* **2007**, *27*, 2292–2301, doi:10.1161/ATVBAHA.107.149179.
335. Tabas, I.; García-Cardena, G.; Owens, G.K. Recent Insights into the Cellular Biology of Atherosclerosis. *Journal of Cell Biology* **2015**, *209*, 13–22, doi:10.1083/jcb.201412052.
336. Fuster, J.J.; Castillo, A.I.; Zaragoza, C.; Ibáñez, B.; Andrés, V. Animal Models of Atherosclerosis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2012; Vol. 105, pp. 1–23 ISBN 978-0-12-394596-9.
337. Hansson, G.K.; Libby, P. The Immune Response in Atherosclerosis: A Double-Edged Sword. *Nat Rev Immunol* **2006**, *6*, 508–519, doi:10.1038/nri1882.

338. Li, A.C.; Glass, C.K. The Macrophage Foam Cell as a Target for Therapeutic Intervention. *Nat Med* **2002**, *8*, 1235–1242, doi:10.1038/nm1102-1235.
339. Wolf, D.; Ley, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res* **2019**, *124*, 315–327, doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
340. Kyaw, T.; Winship, A.; Tay, C.; Kanellakis, P.; Hosseini, H.; Cao, A.; Li, P.; Tipping, P.; Bobik, A.; Toh, B.-H. Cytotoxic and Proinflammatory CD8⁺ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* **2013**, *127*, 1028–1039, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001347.
341. Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Inflammation in Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *54*, 2129–2138, doi:10.1016/j.jacc.2009.09.009.
342. Finn, A.V.; Nakano, M.; Narula, J.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R. Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *ATVB* **2010**, *30*, 1282–1292, doi:10.1161/ATVBHA.108.179739.
343. Tomaniak, M.; Katagiri, Y.; Modolo, R.; De Silva, R.; Khamis, R.Y.; Bourantas, C.V.; Torii, R.; Wentzel, J.J.; Gijssen, F.J.H.; Van Soest, G.; et al. Vulnerable Plaques and Patients: State-of-the-Art. *European Heart Journal* **2020**, *41*, 2997–3004, doi:10.1093/eurheartj/ehaa227.
344. Asada, Y.; Yamashita, A.; Sato, Y.; Hatakeyama, K. Pathophysiology of Atherothrombosis: Mechanisms of Thrombus Formation on Disrupted Atherosclerotic Plaques. *Pathol Int* **2020**, *70*, 309–322, doi:10.1111/pin.12921.
345. Gachet, C. Antiplatelet Drugs: Which Targets for Which Treatments? *J Thromb Haemost* **2015**, *13*, S313–S322, doi:10.1111/jth.12947.
346. Schrör, K. Aspirin and Platelets: The Antiplatelet Action of Aspirin and Its Role in Thrombosis Treatment and Prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* **1997**, *23*, 349–356, doi:10.1055/s-2007-996108.
347. Awtry, E.H.; Loscalzo, J. Aspirin. *Circulation* **2000**, *101*, 1206–1218, doi:10.1161/01.cir.101.10.1206.
348. Finamore, F.; Reny, J.-L.; Malacarne, S.; Fontana, P.; Sanchez, J.-C. A High Glucose Level Is Associated with Decreased Aspirin-Mediated Acetylation of Platelet Cyclooxygenase (COX)-1 at Serine 529: A Pilot Study. *Journal of Proteomics* **2019**, *192*, 258–266, doi:10.1016/j.jprot.2018.09.007.
349. Rodríguez, L.A.G.; Martín-Pérez, M.; Hennekens, C.H.; Rothwell, P.M.; Lanias, A. Bleeding Risk with Long-Term Low-Dose Aspirin: A Systematic Review of Observational Studies. *PLOS ONE* **2016**, *20*.
350. Patrono, C.; García Rodríguez, L.A.; Landolfi, R.; Baigent, C. Low-Dose Aspirin for the Prevention of Atherothrombosis. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 2373–2383, doi:10.1056/NEJMra052717.
351. Gachet, C. ADP Receptors of Platelets and Their Inhibition. *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 222–232, doi:10.1055/s-0037-1616220.
352. Mackman, N.; Bergmeier, W.; Stouffer, G.A.; Weitz, J.I. Therapeutic Strategies for Thrombosis: New Targets and Approaches. *Nat Rev Drug Discov* **2020**, *19*, 333–352, doi:10.1038/s41573-020-0061-0.
353. Baqi, Y.; Müller, C.E. Antithrombotic P2Y₁₂ Receptor Antagonists: Recent Developments in Drug Discovery. *Drug Discovery Today* **2019**, *24*, 325–333, doi:10.1016/j.drudis.2018.09.021.
354. Lasica, R.; Djukanovic, L.; Popovic, D.; Savic, L.; Mrdovic, I.; Radovanovic, N.; Radovanovic, M.R.; Polovina, M.; Stojanovic, R.; Matic, D.; et al. Use of Anticoagulant Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction and Atrial Fibrillation. *Medicina* **2022**, *58*, 338, doi:10.3390/medicina58030338.

355. Verheugt, F.W.A.; Damman, P.; Damen, S.A.J.; Wykrzykowska, J.J.; Woelders, E.C.I.; Van Geuns, R.-J.M. P2Y₁₂ Blocker Monotherapy after Percutaneous Coronary Intervention. *Neth Heart J* **2021**, *29*, 566–576, doi:10.1007/s12471-021-01582-7.
356. Wallentin, L. P2Y₁₂ Inhibitors: Differences in Properties and Mechanisms of Action and Potential Consequences for Clinical Use. *European Heart Journal* **2009**, *30*, 1964–1977, doi:10.1093/eurheartj/ehp296.
357. ANSM Résumé Des Caractéristiques Du Produit - CLOPIDOGREL EG LABO 75 Mg, Comprimé Pelliculé - Base de Données Publique Des Médicaments Available online: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=67233727&typedoc=R> (accessed on 8 January 2024).
358. Bhatt, D.L.; Berger, P.B.; Cacoub, P.; Easton, J.D.; Hamm, C.W.; Mak, K.-H.; Pearson, T.A.; Weber, M.A.; Booth, J. Clopidogrel and Aspirin versus Aspirin Alone for the Prevention of Atherothrombotic Events. *New England Journal of Medicine* **2006**, *24*, 1706–1717, doi:10.1056/NEJMoa060989.
359. Mehta, S.R.; Yusuf, S.; Peters, R.J.G.; Bertrand, M.E.; Lewis, B.S.; Natarajan, M.K.; Malmberg, K.; Rupprecht, H.-J.; Zhao, F.; Chrolavicius, S.; et al. Effects of Pretreatment with Clopidogrel and Aspirin Followed by Long-Term Therapy in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: The PCI-CURE Study. *THE LANCET* **2001**, *358*, 527–533.
360. Sharma, R.; Kumar, P.; Prashanth, S.P.; Belagali, Y. Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease. *Cardiol Ther* **2020**, *9*, 349–361, doi:10.1007/s40119-020-00197-0.
361. Sinnaeve, P.R.; Adriaenssens, T. Dual Antiplatelet Therapy De-Escalation Strategies. *The American Journal of Cardiology* **2021**, *144*, S23–S31, doi:10.1016/j.amjcard.2020.12.020.
362. Roberto, M.; Radovanovic, D.; Buttà, C.; Tersalvi, G.; Krüll, J.; Erne, P.; Rickli, H.; Pedrazzini, G.B.; Moccetti, M. Dual Antiplatelet Therapy Is Under-Prescribed in Patients with Surgically Treated Acute Myocardial Infarction. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* **2021**, *33*, 687–694, doi:10.1093/icvts/ivab159.
363. Wiviott, S.D.; Braunwald, E.; McCabe, C.H.; Montalescot, G.; Ruzyllo, W.; Gottlieb, S.; Neumann, F.-J.; Ardissino, D.; De Servi, S.; Murphy, S.A.; et al. Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* **2007**, *357*, 2001–2015, doi:10.1056/NEJMoa0706482.
364. Kamran, H.; Jneid, H.; Kayani, W.T.; Virani, S.S.; Levine, G.N.; Nambi, V.; Khalid, U. Oral Antiplatelet Therapy After Acute Coronary Syndrome: A Review. *JAMA* **2021**, *325*, 1545, doi:10.1001/jama.2021.0716.
365. Hartmann, G.D.; Egbertson, M.S.; Halczenko, W.; Laswell, W.L.; Duggan, M.E.; Smith, R.L.; Naylor, A.M.; Manno, P.D.; Lynch, R.J.; Zhang, G.; et al. Non-Peptide Fibrinogen Receptor Antagonists. 1. Discovery and Design of Exosite Inhibitors. *Journal of Medical Chemistry* **1992**, *35*, 4060–4062, doi:10.1021/jm00102a020.
366. Scarborough, R.M.; Naughton, M.A.; Teng, W.; Rose, J.W.; Phillips, D.R.; Nannizzi, L.; Arfsten, A.; Campbell, A.M.; Charo, I.F. Design of Potent and Specific Integrin Antagonists. Peptide Antagonists with High Specificity for Glycoprotein IIb-IIIa. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 1066–1073, doi:10.1016/S0021-9258(18)54042-4.
367. Schneider, D.J. Anti-platelet Therapy: Glycoprotein IIb-IIIa Antagonists. *Brit J Clinical Pharma* **2011**, *72*, 672–682, doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03879.x.
368. Schrör, K.; Weber, A.-A. Comparative Pharmacology of GP IIb/IIIa Antagonists. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* **2003**, *15*, 71–80, doi:10.1023/B:THRO.0000003308.63022.8d.
369. Jamasbi, J.; Ayabe, K.; Goto, S.; Nieswandt, B.; Peter, K.; Siess, W. Platelet Receptors as Therapeutic Targets: Past, Present and Future. *Thromb Haemost* **2017**, *117*, 1249–1257, doi:10.1160/TH16-12-0911.

370. Gammie, J.S.; Zenati, M.; Kormos, R.L.; Hattler, B.G.; Wei, L.M.; Pellegrini, R.V.; Griffith, B.P.; Dyke, C.M. Abciximab and Excessive Bleeding in Patients Undergoing Emergency Cardiac Operations. *The Annals of Thoracic Surgery* **1998**, *65*, 465–469, doi:10.1016/S0003-4975(97)01299-X.
371. Junghans, U.; Seitz, R.J.; Aulich, A.; Freund, H.-J.; Siebler, M. Bleeding Risk of Tirofiban, a Nonpeptide GPIIb/IIIa Platelet Receptor Antagonist in Progressive Stroke: An Open Pilot Study. *Cerebrovasc Dis* **2001**, *12*, 308–312, doi:10.1159/000047726.
372. Rasty, S.; Borzak, S.; Tisdale, J.E. Bleeding Associated with Eptifibatide Targeting Higher Risk Patients with Acute Coronary Syndromes: Incidence and Multivariate Risk Factors. *The Journal of Clinical Pharma* **2002**, *42*, 1366–1373, doi:10.1177/0091270002239367.
373. Tigen, M.K.; Ozdil, M.H.; Cincin, A.; Gurel, E.; Sunbul, M.; Sahin, A.; Guctekin, T.; Dogan, Z.; Sayar, N.; Ozben, B. Bleeding Risk with Concomitant Use of Tirofiban and Third-Generation P2Y₁₂ Receptor Antagonists in Patients with Acute Myocardial Infarction: A Real-Life Data. *The Anatolian Journal of Cardiology* **2021**, *25*, 699–705, doi:10.5152/AnatolJCardiol.2021.27974.
374. Bartunek, J.; Barbato, E.; Heyndrickx, G.; Vanderheyden, M.; Wijns, W.; Holz, J.-B. Novel Antiplatelet Agents: ALX-0081, a Nanobody Directed towards von Willebrand Factor. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **2013**, *6*, 355–363, doi:10.1007/s12265-012-9435-y.
375. Lei, X.; Reheman, A.; Hou, Y.; Zhou, H.; Wang, Y.; Marshall, A.H.; Liang, C.; Dai, X.; Li, B.X.; Vanhoorelbeke, K.; et al. Anfibatide, a Novel GPIb Complex Antagonist, Inhibits Platelet Adhesion and Thrombus Formation in Vitro and in Vivo in Murine Models of Thrombosis. *Thromb Haemost* **2014**, *112*, 279–289, doi:10.1160/TH13-06-0490.
376. Li, T.; Fan, M.; Hou, S.; Li, X.; Barry, D.M.; Jin, H.; Luo, S.; Kong, F.; Lau, L.; Dai, X.; et al. A Novel Snake Venom-derived GPIb Antagonist, Anfibatide, Protects Mice from Acute Experimental Ischaemic Stroke and Reperfusion Injury. *British J Pharmacology* **2015**, *172*, 3904–3916, doi:10.1111/bph.13178.
377. Ungerer, M.; Rosport, K.; Bültmann, A.; Piechatzek, R.; Uhland, K.; Schlieper, P.; Gawaz, M.; Münch, G. Novel Antiplatelet Drug Revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) Specifically and Efficiently Inhibited Collagen-Induced Platelet Aggregation Without Affecting General Hemostasis in Humans. *Circulation* **2011**, *123*, 1891–1899, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980623.
378. Uphaus, T.; Richards, T.; Weimar, C.; Neugebauer, H.; Poli, S.; Weissenborn, K.; Imray, C.; Michalski, D.; Rashid, H.; Loftus, I.; et al. Revacept, an Inhibitor of Platelet Adhesion in Symptomatic Carotid Stenosis: A Multicenter Randomized Phase II Trial. *Stroke* **2022**, *53*, 2718–2729, doi:10.1161/STROKEAHA.121.037006.
379. Mayer, K.; Hein-Rothweiler, R.; Schüpke, S.; Janisch, M.; Bernlochner, I.; Ndrepepa, G.; Sibbing, D.; Gori, T.; Borst, O.; Holdenrieder, S.; et al. Efficacy and Safety of Revacept, a Novel Lesion-Directed Competitive Antagonist to Platelet Glycoprotein VI, in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention for Stable Ischemic Heart Disease: The Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled ISAR-PLASTER Phase 2 Trial. *JAMA Cardiol* **2021**, *6*, 753, doi:10.1001/jamacardio.2021.0475.
380. Lebozec, K.; Jandrot-Perrus, M.; Avenard, G.; Favre-Bulle, O.; Billiald, P. Design, Development and Characterization of ACT017, a Humanized Fab That Blocks Platelet's Glycoprotein VI Function without Causing Bleeding Risks. *mAbs* **2017**, *9*, 945–958, doi:10.1080/19420862.2017.1336592.
381. Voors-Pette, C.; Lebozec, K.; Dogterom, P.; Jullien, L.; Billiald, P.; Ferlan, P.; Renaud, L.; Favre-Bulle, O.; Avenard, G.; Machacek, M.; et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab: First-in-Human Healthy Volunteer Trial. *ATVB* **2019**, *39*, 956–964, doi:10.1161/ATVBAHA.118.312314.

382. Renaud, L.; Lebozec, K.; Voors-Pette, C.; Dogterom, P.; Billiald, P.; Jandrot Perrus, M.; Pletan, Y.; Machacek, M. Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Glencicimab (ACT017) a Glycoprotein VI Inhibitor of Collagen-Induced Platelet Aggregation. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2020**, *60*, 1198–1208, doi:10.1002/jcph.1616.
383. Billiald, P.; Slater, A.; Welin, M.; Clark, J.C.; Loyau, S.; Pugnière, M.; Jiacomini, I.G.; Rose, N.; Lebozec, K.; Toledano, E.; et al. Targeting Platelet GPVI with Glencicimab: A Novel Mechanism for Inhibition. *Blood Advances* **2023**, *7*, 1258–1268, doi:10.1182/bloodadvances.2022007863.
384. ESOC 2022 – Late Breaking Science, Ongoing Trials & Young Stroke Physicians and Researchers. *European Stroke Journal* **2022**, *7*, 574 (1758), doi:10.1177/23969873221094907.
385. Mazighi, M.; Köhrmann, M.; Lemmens, R.; Lyrer, P.A.; Molina, C.A.; Richard, S.; Toni, D.; Plétan, Y.; Sari, A.; Meilhoc, A.; et al. Safety and Efficacy of Platelet Glycoprotein VI Inhibition in Acute Ischaemic Stroke (ACTIMIS): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1b/2a Trial. *The Lancet Neurology* **2024**, *23*, 157–167, doi:10.1016/S1474-4422(23)00427-1.
386. Moon, J.Y.; Franchi, F.; Rollini, F.; Angiolillo, D.J. Role for Thrombin Receptor Antagonism With Vorapaxar in Secondary Prevention of Atherothrombotic Events: From Bench to Bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **2018**, *23*, 23–37, doi:10.1177/1074248417708617.
387. Morrow, D.A.; Braunwald, E.; Bonaca, M.P.; Ameriso, S.F.; Dalby, A.J.; Fish, M.P.; Fox, K.A.A.; Lipka, L.J.; Liu, X.; Nicolau, J.C.; et al. Vorapaxar in the Secondary Prevention of Atherothrombotic Events. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 1404–1413, doi:10.1056/NEJMoa1200933.
388. Tantry, U.S.; Bliden, K.P.; Chaudhary, R.; Novakovic, M.; Rout, A.; Gurbel, P.A. Vorapaxar in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Future Cardiology* **2020**, *16*, 373–384, doi:10.2217/fca-2019-0090.
389. Gurbel, P.A.; Bliden, K.P.; Turner, S.E.; Tantry, U.S.; Gesheff, M.G.; Barr, T.P.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *ATVB* **2016**, *36*, 189–197, doi:10.1161/ATVBAHA.115.306777.
390. Kuliopulos, A.; Gurbel, P.A.; Rade, J.J.; Kimmelstiel, C.D.; Turner, S.E.; Bliden, K.P.; Fletcher, E.K.; Cox, D.H.; Covic, L.; on behalf of the TRIP-PCI Investigators PAR1 (Protease-Activated Receptor 1) Pepducin Therapy Targeting Myocardial Necrosis in Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Cardiac Catheterization: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study. *ATVB* **2020**, *40*, 2990–3003, doi:10.1161/ATVBAHA.120.315168.
391. Wong, P.C.; Seiffert, D.; Bird, J.E.; Watson, C.A.; Bostwick, J.S.; Giancarli, M.; Allegretto, N.; Hua, J.; Harden, D.; Guay, J.; et al. Blockade of Protease-Activated Receptor-4 (PAR4) Provides Robust Antithrombotic Activity with Low Bleeding. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaaf5294, doi:10.1126/scitranslmed.aaf5294.
392. Wilson, S.J.; Ismat, F.A.; Wang, Z.; Cerra, M.; Narayan, H.; Raftis, J.; Gray, T.J.; Connell, S.; Garonzik, S.; Ma, X.; et al. PAR4 (Protease-Activated Receptor 4) Antagonism With BMS-986120 Inhibits Human Ex Vivo Thrombus Formation. *ATVB* **2018**, *38*, 448–456, doi:10.1161/ATVBAHA.117.310104.
393. Kerzmann, A.; Haumann, A.; Boesmans, E.; Detry, O.; Defraigne, J.O. L'ischémie mésentérique aiguë. *Revue Médicale Liège* **2018**, *73*, 300–303.
394. Dini, C.S.; Nardi, G.; Ristalli, F.; Mattesini, A.; Hamiti, B.; Di Mario, C. Contemporary Approach to Heavily Calcified Coronary Lesions. *Interv Cardiol* **2019**, *14*, 154–163, doi:10.15420/icr.2019.19.R1.
395. Chen, D.; Jepson, N. Coronary Stent Technology: A Narrative Review. *Medical Journal of Australia* **2016**, *205*, 277–281, doi:10.5694/mja16.00444.

396. Mehta, L.S.; Beckie, T.M.; DeVon, H.A.; Grines, C.L.; Krumholz, H.M.; Johnson, M.N.; Lindley, K.J.; Vaccarino, V.; Wang, T.Y.; Watson, K.E.; et al. Acute Myocardial Infarction in Women. *Circulation* **2016**, *133*, 916–947, doi:10.1161/CIR.0000000000000351.
397. Lowe, H.C.; Oesterle, S.N.; Khachigian, L.M. Coronary In-Stent Restenosis: Current Status and Future Strategies. *Journal of the American College of Cardiology* **2002**, *39*, 183–193, doi:10.1016/S0735-1097(01)01742-9.
398. Fogarty, T.J.; Cranley, J.J. Catheter Technic for Arterial Embolectomy: *Annals of Surgery* **1965**, *161*, 325–330, doi:10.1097/0000658-196503000-00001.
399. Bacourt, F.; Lasry, J.-L. Embolies artérielles des membres. *EMC - Cardiologie-Angéiologie* **2005**, *2*, 504–514, doi:10.1016/j.emcaa.2005.09.005.
400. Thompson, J.E. The Evolution of Surgery for the Treatment and Prevention of Stroke. *Stroke* **1996**, *27*, 1427–1434, doi:10.1161/01.str.27.8.1427.
401. Sigwart, U.; Puel, J.; Mirkovitch, V.; Joffre, F.; Kappenberger, L. Intravascular Stents to Prevent Occlusion and Re-Stenosis after Transluminal Angioplasty. *NEJM* **1987**, *316*, 701–706.
402. Chhabra, L.; Zain, M.A.; Siddiqui, W.J. *Coronary Stents*; StatPearls [Internet].; 2023;
403. Valdes, P.J.; Akbar, H.; Kahloon, R.A.; Diaz, M.A. *Intracoronary Stents*; StatPearls [Internet].; 2023;
404. Raikar, A.S.; Priya, S.; Bhilegaonkar, S.P.; Somnache, S.N.; Kalaskar, D.M. Surface Engineering of Bioactive Coatings for Improved Stent Hemocompatibility: A Comprehensive Review. *Materials* **2023**, *16*, 6940, doi:10.3390/ma16216940.
405. Senst, B.; Goyal, A.; Basit, H.; Borger, J. *Drug Eluting Stent Compounds*; StatPearls [Internet].; 2023;
406. Lüscher, T.F.; Steffel, J.; Eberli, F.R.; Joner, M.; Nakazawa, G.; Tanner, F.C.; Virmani, R. Drug-Eluting Stent and Coronary Thrombosis: Biological Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation* **2007**, *115*, 1051–1058, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675934.
407. Pache, J.; Dibra, A.; Mehilli, J.; Dirschinger, J.; Schömig, A.; Kastrati, A. Drug-Eluting Stents Compared with Thin-Strut Bare Stents for the Reduction of Restenosis: A Prospective, Randomized Trial. *European Heart Journal* **2005**, *26*, 1262–1268, doi:10.1093/eurheartj/ehi098.
408. Vishnevetsky, D.; Patel, P.; Tijerino, H.; Gandhi, P.J. Sirolimus-Eluting Coronary Stent. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2004**, *61*, 449–456, doi:10.1093/ajhp/61.5.449.
409. Jinnouchi, H.; Torii, S.; Sakamoto, A.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R.; Finn, A.V. Fully Bioresorbable Vascular Scaffolds: Lessons Learned and Future Directions. *Nat Rev Cardiol* **2019**, *16*, 286–304, doi:10.1038/s41569-018-0124-7.
410. Tan, H.; Ananthakrishna, R. A Review of Bioresorbable Scaffolds: Hype or Hope? *smedj* **2017**, *58*, 512–515, doi:10.11622/smedj.2016178.
411. Gallinoro, E.; Almendarez, M.; Alvarez-Velasco, R.; Barbato, E.; Avanzas, P. Bioresorbable Stents: Is the Game Over? *International Journal of Cardiology* **2022**, *361*, 20–28, doi:10.1016/j.ijcard.2022.05.024.
412. Li, Y.; Wang, J.; Sheng, K.; Miao, F.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Hou, R.; Mei, D.; Sun, Y.; Zheng, Y.; et al. Optimizing Structural Design on Biodegradable Magnesium Alloy Vascular Stent for Reducing Strut Thickness and Raising Radial Strength. *Materials & Design* **2022**, *220*, 110843, doi:10.1016/j.matdes.2022.110843.
413. Fornell, D. Abbott Will End Sales of Absorb Bioresorbable Stent Available online: <http://www.dicardiology.com/article/abbott-will-end-sales-absorb-bioresorbable-stent> (accessed on 3 December 2023).

414. Lafont, A.; Mennuni, M.G. What Happened to the Bioresorbable Scaffold Concept: Black Tide or Chernobyl? *Circ: Cardiovascular Interventions* **2018**, *11*, doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.117.006283.
415. Richeux, V. Angioplastie coronaire : premier test réussi pour un stent d'un nouveau genre Available online: <http://francais.medscape.com/voirarticle/3610086> (accessed on 3 December 2023).
416. Modi, K.; Soos, M.P.; Mahajan, K. *Stent Thrombosis*; StatPearls [Internet].; 2021;
417. Lotfi, A.; Reejhsinghani, R. Prevention of Stent Thrombosis: Challenges and Solutions. *VHRM* **2015**, *11*, 93–106, doi:10.2147/VHRM.S43357.
418. Holmes, D.R.; Kereiakes, D.J.; Garg, S.; Serruys, P.W.; Dehmer, G.J.; Ellis, S.G.; Williams, D.O.; Kimura, T.; Moliterno, D.J. Stent Thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* **2010**, *56*, 1357–1365, doi:10.1016/j.jacc.2010.07.016.
419. Gori, T.; Polimeni, A.; Indolfi, C.; Räber, L.; Adriaenssens, T.; Münzel, T. Predictors of Stent Thrombosis and Their Implications for Clinical Practice. *Nat Rev Cardiol* **2019**, *16*, 243–256, doi:10.1038/s41569-018-0118-5.
420. Watts, T.E.; Chatterjee, A.; Leesar, M.A. Stent Thrombosis: Early, Late, and Very Late. In *Cardiovascular Thrombus*; Academic Press, 2018; pp. 217–224 ISBN 978-0-12-812615-8.
421. Kolandaivelu, K.; Swaminathan, R.; Gibson, W.J.; Kolachalama, V.B.; Nguyen-Ehrenreich, K.-L.; Giddings, V.L.; Coleman, L.; Wong, G.K.; Edelman, E.R. Stent Thrombogenicity Early in High-Risk Interventional Settings Is Driven by Stent Design and Deployment and Protected by Polymer-Drug Coatings. *Circulation* **2011**, *123*, 1400–1409, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.003210.
422. Lau, K.-W.; Mak, K.-H.; Hung, J.-S.; Sigwart, U. Clinical Impact of Stent Construction and Design in Percutaneous Coronary Intervention. *American Heart Journal* **2004**, *147*, 764–773, doi:10.1016/j.ahj.2003.12.007.
423. Claessen, B.E.; Henriques, J.P.S.; Jaffer, F.A.; Mehran, R.; Piek, J.J.; Dangas, G.D. Stent Thrombosis. *JACC: Cardiovascular Interventions* **2014**, *7*, 1081–1092, doi:10.1016/j.jcin.2014.05.016.
424. Jaffer, I.H.; Fredenburgh, J.C.; Hirsh, J.; Weitz, J.I. Medical Device-Induced Thrombosis: What Causes It and How Can We Prevent It? *J Thromb Haemost* **2015**, *13*, S72–S81, doi:10.1111/jth.12961.
425. Zafar, M.U.; Bravo-Cordero, J.J.; Torramade-Moix, S.; Escolar, G.; Jerez-Dolz, D.; Lev, E.I.; Badimon, J.J. Effects of Electret Coating Technology on Coronary Stent Thrombogenicity. *Platelets* **2022**, *33*, 312–319, doi:10.1080/09537104.2021.1912313.
426. Jiang, W.; Zhao, W.; Zhou, T.; Wang, L.; Qiu, T. A Review on Manufacturing and Post-Processing Technology of Vascular Stents. *Micromachines* **2022**, *13*, 140, doi:10.3390/mi13010140.
427. Scafa Udriște, A.; Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A.M.; Bădilă, E. Cardiovascular Stents: A Review of Past, Current, and Emerging Devices. *Materials* **2021**, *14*, 2498, doi:10.3390/ma14102498.
428. Nazneen, F.; Herzog, G.; Arrigan, D.W.M.; Caplice, N.; Benvenuto, P.; Galvin, P.; Thompson, M. Surface Chemical and Physical Modification in Stent Technology for the Treatment of Coronary Artery Disease. *J. Biomed. Mater. Res.* **2012**, *100B*, 1989–2014, doi:10.1002/jbm.b.32772.
429. Sonmez, O.; Sonmez, M. Role of Platelets in Immune System and Inflammation. *Porto Biomedical Journal* **2017**, *2*, 311–314, doi:10.1016/j.pbj.2017.05.005.
430. Köster, R.; Vieluf, D.; Kiehn, M.; Sommerauer, M.; Kähler, J.; Baldus, S.; Meinertz, T.; Hamm, C.W. Nickel and Molybdenum Contact Allergies in Patients with Coronary In-Stent Restenosis. *THE LANCET* **2000**, 356.

431. Szott, L.M.; Irvin, C.A.; Trollsas, M.; Hossainy, S.; Ratner, B.D. Blood Compatibility Assessment of Polymers Used in Drug Eluting Stent Coatings. *Biointerphases* **2016**, *11*, 029806, doi:10.1116/1.4944586.
432. Jinnouchi, H.; Kutyna, M.; Torii, S.; Cheng, Q.; Sakamoto, A.; Guo, L.; Cornelissen, A.; Perkins, L.E.L.; Hossainy, S.F.; Pacetti, S.D.; et al. Comparison of Acute Thrombogenicity and Albumin Adsorption in Three Different Durable Polymer Coronary Drug-Eluting Stents. *EuroIntervention* **2021**, *17*, 248–256, doi:10.4244/EIJ-D-19-00938.
433. Iqbal, J.; Gunn, J.; Serruys, P.W. Coronary Stents: Historical Development, Current Status and Future Directions. *British Medical Bulletin* **2013**, *106*, 193–211, doi:10.1093/bmb/ldt009.
434. Hara, H.; Nakamura, M.; Palmaz, J.C.; Schwartz, R.S. Role of Stent Design and Coatings on Restenosis and Thrombosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 377–386, doi:10.1016/j.addr.2006.01.022.
435. DePalma, V.A.; Baier, R.E.; Ford, J.W.; Gott, V.L.; Furuse, A. Investigation of Three-Surface Properties of Several Metals and Their Relation to Blood Compatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* **1972**, *6*, 37–75, doi:10.1002/jbm.820060406.
436. Babapulle, M.N.; Eisenberg, M.J. Coated Stents for the Prevention of Restenosis: Part I. *Circulation* **2002**, *106*, 2734–2740, doi:10.1161/01.CIR.0000038982.49640.70.
437. Trigwell, S.; Hayden, R.D.; Nelson, K.F.; Selvaduray, G. Effects of Surface Treatment on the Surface Chemistry of NiTi Alloy for Biomedical Applications. *Surf. Interface Anal.* **1998**, *26*, 483–489, doi:10.1002/(SICI)1096-9918(199806)26:7<483::AID-SIA388>3.0.CO;2-5.
438. Eliaz, N.; Nissan, O. Innovative Processes for Electropolishing of Medical Devices Made of Stainless Steels. *J Biomedical Materials Res* **2007**, *83A*, 546–557, doi:10.1002/jbm.a.31429.
439. De Scheerder, I.; Sohler, J.; Wang, K.; Verbeken, E.; Zhou, X.R.; Froyen, L.; Van Humbeeck, J.; Piessens, J.; Van De Werf, F. Metallic Surface Treatment Using Electrochemical Polishing Decreases Thrombogenicity and Neointimal Hyperplasia of Coronary Stents. *J Interven Cardiology* **2000**, *13*, 179–185, doi:10.1111/j.1540-8183.2000.tb00286.x.
440. Raval, A.; Choubey, A.; Engineer, C.; Kothwala, D. Development and Assessment of 316LVM Cardiovascular Stents. *Materials Science and Engineering A* **2004**, *386*, 331–343, doi:10.1016/S0921-5093(04)00974-8.
441. Huang, B.; Gale, D.C.; Castro, D.; Limon, T.A. Methods of Treating the Polymeric Surfaces of a Stent with a Fluid Including a Solvent for the Surface Polymer Are Dis Closed. 2007, 20.
442. Al-Bayati, A.R.; Nogueira, R.G.; Haussen, D.C. Carotid Artery Stenting: Applications and Technical Considerations. *Neurology* **2021**, *97*, S137–S144, doi:10.1212/WNL.0000000000012802.
443. Chiastra, C.; Dubini, G.; Migliavacca, F. Hemodynamic Perturbations Due to the Presence of Stents. In *Biomechanics of Coronary Atherosclerotic Plaque*; Elsevier, 2021; pp. 251–271 ISBN 978-0-12-817195-0.
444. Ng, J.; Bourantas, C.V.; Torii, R.; Ang, H.Y.; Tenekecioglu, E.; Serruys, P.W.; Foin, N. Local Hemodynamic Forces After Stenting: Implications on Restenosis and Thrombosis. *ATVB* **2017**, *37*, 2231–2242, doi:10.1161/ATVBAHA.117.309728.
445. Mazurek, A.; Malinowski, K.; Rosenfield, K.; Capoccia, L.; Speziale, F.; de Donato, G.; Setacci, C.; Wissgott, C.; Sirignano, P.; Tekieli, L.; et al. Clinical Outcomes of Second- versus First-Generation Carotid Stents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCM* **2022**, *11*, 4819, doi:10.3390/jcm11164819.
446. Pfaff, J.A.R.; Maurer, C.; Broussalis, E.; Janssen, H.; Blanc, R.; Dargazanli, C.; Costalat, V.; Piotin, M.; Runck, F.; Berlis, A.; et al. Acute Thromboses and Occlusions of Dual Layer Carotid Stents in

- Endovascular Treatment of Tandem Occlusions. *J NeuroIntervent Surg* **2020**, *12*, 33–37, doi:10.1136/neurintsurg-2019-015032.
447. Yilmaz, U.; Körner, H.; Mühl-Benninghaus, R.; Simgen, A.; Kraus, C.; Walter, S.; Behnke, S.; Faßbender, K.; Reith, W.; Unger, M.M. Acute Occlusions of Dual-Layer Carotid Stents After Endovascular Emergency Treatment of Tandem Lesions. *Stroke* **2017**, *48*, 2171–2175, doi:10.1161/STROKEAHA.116.015965.
448. Klail, T.; Kurmann, C.; Kaesmacher, J.; Mujanovic, A.; Piechowiak, E.I.; Dobrocky, T.; Pilgram-Pastor, S.; Scutelnic, A.; Heldner, M.R.; Gralla, J.; et al. Safety and Efficacy of Carotid Artery Stenting with the CGuard Double-Layer Stent in Acute Ischemic Stroke. *Clin Neuroradiol* **2023**, *33*, 237–244, doi:10.1007/s00062-022-01209-3.
449. Serruys, P.W.; De Jaegere, P.; Kiemeneij, F.; Macaya, C.; Rutsch, W.; Heyndrickx, G.; Emanuelson, H.; Marco, J.; Legrand, V.; Materne, P.; et al. A Comparison of Balloon-Expandable-Stent Implantation with Balloon Angioplasty in Patients with Coronary Artery Disease. Benestent Study Group. *NEJM* **1994**, *331*, 489–495, doi:10.1056/NEJM199408253310801.
450. Fischman, D.; Leon, M.B.; Baim, D.S.; Schatz, R.; Savage, M.; Penn, I.; Detre, K.; Veltri, L.; Ricci, D.; Nobuyoshi, M.; et al. A Randomized Comparison of Coronary-Stent Placement and Balloon Angioplasty in the Treatment of Coronary Artery Disease. *NEJM* **1994**, *331*, 496–501, doi:10.1056/NEJM199408253310802.
451. Wieneke, H.; Sawitowski, T.; Wnendt, S.; Fischer, A.; Dirsch, O.; Karoussos, I.A.; Erbel, R. Stent Coating: A New Approach in Interventional Cardiology. *Herz* **2002**, *27*, 518–526, doi:10.1007/s00059-002-2405-4.
452. Pendyala, L.; Jabara, R.; Robinson, K.; Chronos, N. Passive and Active Polymer Coatings for Intracoronary Stents: Novel Devices to Promote Arterial Healing. *J Interven Cardiology* **2009**, *22*, 37–48, doi:10.1111/j.1540-8183.2009.00423.x.
453. Edelman, E.R.; Seifert, P.; Groothuis, A.; Morss, A.; Bornstein, D.; Rogers, C. Gold-Coated NIR Stents in Porcine Coronary Arteries. *Circulation* **2001**, *103*, 429–434, doi:10.1161/01.CIR.103.3.429.
454. Harding, S.A.; McKenna, C.J.; Flapan, A.D.; Boon, N.A. Long-Term Clinical Safety and Efficacy of NIROYAL vs. NIR Intracoronary Stent. *Cathet. Cardiovasc. Intervent.* **2001**, *54*, 141–145, doi:10.1002/ccd.1255.
455. Svedman, C.; Tillman, C.; Gustavsson, C.G.; Möller, H.; Frennby, B.; Bruze, M. Contact Allergy to Gold in Patients with Gold-plated Intracoronary Stents. *Contact Dermatitis* **2005**, *52*, 192–196, doi:10.1111/j.0105-1873.2005.00522.x.
456. Kolandaivelu, K.; Edelman, E.R. Environmental Influences on Endovascular Stent Platelet Reactivity: An In Vitro Comparison of Stainless Steel and Gold Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *70A*, 186–193, doi:10.1002/jbm.a.30023.
457. Eriksson, C.; Nygren, H. The Initial Reactions of Graphite and Gold with Blood. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 130–136, doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199710)37:1<130::AID-JBM16>3.0.CO;2-K.
458. Monnink, S.H.; van Boven, A.J.; Peels, H.O.; Tigchelaar, I.; de Kam, P.J.; Crijns, H.J.; van Oeveren, W. Silicon-Carbide Coated Coronary Stents Have Low Platelet and Leukocyte Adhesion during Platelet Activation. *J Investig Med* **1999**, *47*, 304–310.
459. Harder, C.; Rzany, A.; Schaldach, M. Coating of Vascular Stents with Antithrombogenic Amorphous Sil. **1999**.
460. Heublein, B.; Pethig, K.; Elsayed, A.M. Silicon Carbide Coating – A Semiconducting Hybrid Design of Coronary Stents – A Feasibility Study. *J Invasive Cardiol* **1998**, *10*, 255–262.

461. Kalnins, U.; Erglis, A.; Dinne, I.; Kumsars, I.; Jegere, S. Clinical Outcomes of Silicon Carbide Coated Stents in Patients with Coronary Artery Disease. *Medical Science Monitor* **2002**, *8*, 16–20.
462. Unverdorben, M.; Sattler, K.; Degenhardt, R.; Fries, R.; Abt, B.; Wagner, E.; Koehler, H.; Scholz, M.; Ibrahim, H.; Tews, K.-H.; et al. Comparison of a Silicon Carbide Coated Stent versus a Noncoated Stent in Humans: *The Journal of Interventional Cardiology* **2003**, *16*, 325–333, doi:10.1034/j.1600-6143.2003.08058.x.
463. Hansen, K.W.; Jeger, R.; Sørensen, R.; Kaiser, C.; Pfisterer, M.; Biering-Sørensen, T.; Bjerking, L.H.; Galatius, S. Do Ultrathin Strut Bare-Metal Stents with Passive Coating Improve Efficacy in Large Coronary Arteries? Insights from the Randomized, Multicenter BASKET-PROVE Trials. *BMC Cardiovasc Disord* **2019**, *19*, 226, doi:10.1186/s12872-019-1199-8.
464. Gutensohn, K.; Beythien, C.; Bau, J.; Fenner, T.; Grewe, P.; Koester, R.; Padmanaban, K.; Kuehnl, P. In Vitro Analyses of Diamond-like Carbon Coated Stents: Reduction of Metal Ion Release, Platelet Activation, and Thrombogenicity. *Thrombosis Research* **2000**, *9*.
465. Airoldi, F.; Colombo, A.; Tavano, D.; Stankovic, G.; Klugmann, S.; Paolillo, V.; Bonizzoni, E.; Briguori, C.; Carlino, M.; Montorfano, M.; et al. Comparison of Diamond-like Carbon-Coated Stents versus Uncoated Stainless Steel Stents in Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology* **2004**, *93*, 474–477, doi:10.1016/j.amjcard.2003.10.048.
466. Antoniucci, D.; Valenti, R.; Migliorini, A.; Moschi, G.; Trapani, M.; Bolognese, L.; Santoro, G.M.; Cerisano, G. Clinical and Angiographic Outcomes Following Elective Implantation of the Carbostent in Patients at High Risk of Restenosis and Target Vessel Failure. *Cathet. Cardiovasc. Intervent.* **2001**, *54*, 420–426, doi:10.1002/ccd.2004.
467. Ando, K.; Ishii, K.; Tada, E.; Kataoka, K.; Hirohata, A.; Goto, K.; Kobayashi, K.; Tsutsui, H.; Nakahama, M.; Nakashima, H.; et al. Prospective Multi-Center Registry to Evaluate Efficacy and Safety of the Newly Developed Diamond-like Carbon-Coated Cobalt–Chromium Coronary Stent System. *Cardiovasc Interv and Ther* **2017**, *32*, 225–232, doi:10.1007/s12928-016-0407-z.
468. Windecker, S.; Mayer, I.; De Pasquale, G.; Maier, W.; Dirsch, O.; De Groot, P.; Wu, Y.-P.; Noll, G.; Leskosek, B.; Meier, B.; et al. Stent Coating With Titanium-Nitride-Oxide for Reduction of Neointimal Hyperplasia. *Circulation* **2001**, *104*, 928–933, doi:10.1161/hc3401.093146.
469. Windecker, S.; Simon, R.; Lins, M.; Klauss, V.; Eberli, F.R.; Roffi, M.; Pedrazzini, G.; Moccetti, T.; Wenaweser, P.; Togni, M.; et al. Randomized Comparison of a Titanium-Nitride-Oxide-Coated Stent With a Stainless Steel Stent for Coronary Revascularization: The TiNOX Trial. *Circulation* **2005**, *111*, 2617–2622, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.486647.
470. Moschovitis, A.; Simon, R.; Seidenstücker, A.; Klauss, V.; Baylacher, M.; Lüscher, T.F.; Moccetti, T.; Windecker, S.; Meier, B.; Hess, O.M. Randomised Comparison of Titanium-Nitride-Oxide Coated Stents with Bare Metal Stents: Five Year Follow-up of the TiNOX Trial. *EuroIntervention* **2010**, *6*, 63–68.
471. Tonino, P.A.L.; Pijls, N.H.J.; Collet, C.; Nmmas, W.; Van Der Heyden, J.; Romppanen, H.; Kervinen, K.; Airaksinen, J.K.E.; Sia, J.; Lalmand, J.; et al. Titanium-Nitride-Oxide-Coated Versus Everolimus-Eluting Stents in Acute Coronary Syndrome. *JACC: Cardiovascular Interventions* **2020**, *13*, 1697–1705, doi:10.1016/j.jcin.2020.04.021.
472. Mani, G.; Feldman, M.D.; Patel, D.; Agrawal, C.M. Coronary Stents: A Materials Perspective. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1689–1710, doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.042.
473. Kraitzer, A.; Kloog, Y.; Zilberman, M. Approaches for Prevention of Restenosis. *J Biomed Mater Res* **2008**, *85B*, 583–603, doi:10.1002/jbm.b.30974.
474. Joner, M.; Finn, A.V.; Farb, A.; Mont, E.K.; Kolodgie, F.D.; Ladich, E.; Kutys, R.; Skorija, K.; Gold, H.K.; Virmani, R. Pathology of Drug-Eluting Stents in Humans. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *48*, 193–202, doi:10.1016/j.jacc.2006.03.042.

475. van der Giessen, W.J.; Lincoff, A.M.; Schwartz, R.S.; van Beusekom, H.M.M.; Serruys, P.W.; Holmes, D.R.; Ellis, S.G.; Topol, E.J. Marked Inflammatory Sequelae to Implantation of Biodegradable and Nonbiodegradable Polymers in Porcine Coronary Arteries. *Circulation* **1996**, *94*, 1690–1697, doi:10.1161/01.CIR.94.7.1690.
476. Vaina, S.; Serruys, P.W. Progressive Stent Technologies: New Approaches for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2006**, *3*, 783–797, doi:10.1517/17425247.3.6.783.
477. Shikanov, A.; Vaisman, B.; Krasko, M.Y.; Nyska, A.; Domb, A.J. Poly(Sebacic Acid- Co -ricinoleic Acid) Biodegradable Carrier for Paclitaxel: *In Vitro* Release and *in Vivo* Toxicity. *J Biomedical Materials Res* **2004**, *69A*, 47–54, doi:10.1002/jbm.a.20101.
478. Beshchasna, N.; Saqib, M.; Kraskiewicz, H.; Wasyluk, Ł.; Kuzmin, O.; Duta, O.C.; Fikai, D.; Ghizdavet, Z.; Marin, A.; Fikai, A.; et al. Recent Advances in Manufacturing Innovative Stents. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 349, doi:10.3390/pharmaceutics12040349.
479. Hernández-Enríquez, M.; Lairez, O.; Campelo-Parada, F.; Lhermusier, T.; Bouisset, F.; Roncalli, J.; Elbaz, M.; Carrié, D.; Boudou, N. Outcomes after Use of Covered Stents to Treat Coronary Artery Perforations. Comparison of Old and New-generation Covered Stents. *J Interven Cardiology* **2018**, *31*, 617–623, doi:10.1111/joic.12525.
480. Lewis, A.L.; Furze, J.D.; Small, S.; Robertson, J.D.; Higgins, B.J.; Taylor, S.; Ricci, D.R. Long-term Stability of a Coronary Stent Coating Post-implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *63*, 699–705, doi:10.1002/jbm.10387.
481. Grenadier, E.; Roguin, A.; Hertz, I.; Peled, B.; Boulos, M.; Nikolsky, E.; Amikam, S.; Kerner, A.; Cohen, S.; Beyar, R. Stenting Very Small Coronary Narrowings (< 2 Mm) Using the Biocompatible Phosphorylcholine-coated Coronary Stent. *Cathet Cardio Intervent* **2002**, *55*, 303–308, doi:10.1002/ccd.10130.
482. Habara, S.; Mitsudo, K.; Kadota, K.; Goto, T.; Fujii, S.; Yamamoto, H.; Katoh, H.; Oka, N.; Fuku, Y.; Hosogi, S.; et al. Serial Clinical and Angiographic Follow-Up After Phosphorylcholine-Coated Stent Implantation. *Int. Heart J.* **2011**, *52*, 88–91, doi:10.1536/ihj.52.88.
483. Verheye, S.; Markou, C.P.; Salame, M.Y.; Wan, B.; King, S.B.; Robinson, K.A.; Chronos, N.A.F.; Hanson, S.R. Reduced Thrombus Formation by Hyaluronic Acid Coating of Endovascular Devices. *ATVB* **2000**, *20*, 1168–1172, doi:10.1161/01.ATV.20.4.1168.
484. Holmes, D.R.; Camrud, A.R.; Jorgenson, M.A.; Edwards, W.D.; Schwartz, R.S. Polymeric Stenting in the Porcine Coronary Artery Model: Differential Outcome of Exogenous Fibrin Sleeves versus Polyurethane-Coated Stents. *Journal of the American College of Cardiology* **1994**, *24*, 525–531, doi:10.1016/0735-1097(94)90313-1.
485. McKenna, C.J.; Camrud, A.R.; Sangiorgi, G.; Kwon, H.M.; Edwards, W.D.; Holmes, D.R.; Schwartz, R.S. Fibrin-Film Stenting in a Porcine Coronary Injury Model: Efficacy and Safety Compared With Uncoated Stents. *Journal of the American College of Cardiology* **1998**, *31*, 1434–1438, doi:10.1016/S0735-1097(98)00080-1.
486. Mühl-Benninghaus, R.; Fries, F.; Kießling, M.; Tomori, T.; Krajewski, S.; Simgen, A.; Bauer, S.; Hey, N.; Brynda, E.; Taborska, J.; et al. Vascular Response on a Novel Fibrin-Based Coated Flow Diverter. *Cardiovasc Intervent Radiol* **2022**, *45*, 236–243, doi:10.1007/s00270-021-03007-9.
487. Ahn, Y.K.; Jeong, M.H.; Kim, J.W.; Kim, S.H.; Cho, J.H.; Cho, J.G.; Park, C.S.; Juhng, S.W.; Park, J.C.; Kang, J.C. Preventive Effects of the Heparin-Coated Stent on Restenosis in the Porcine Model. *Cathet. Cardiovasc. Intervent.* **1999**, *48*, 324–330, doi:10.1002/(SICI)1522-726X(199911)48:3<324::AID-CCD20>3.0.CO;2-K.
488. De Scheerder, I.; Wang, K.; Wilczek, K.; Meuleman, D.; Van Amsterdam, R.; Vogel, G.; Piessens, J.; Van de Werf, F. Experimental Study of Thrombogenicity and Foreign Body Reaction Induced

- by Heparin-Coated Coronary Stents. *Circulation* **1997**, *95*, 1549–1553, doi:10.1161/01.cir.95.6.1549.
489. Wöhrle, J.; Al-Khayer, E.; Grötzing, U. Comparison of the Heparin Coated vs. the Uncoated Jostent®—No Influence on Restenosis or Clinical Outcome. *ACC Current Journal Review* **2002**, *11*, 53–54, doi:10.1016/S1062-1458(02)00555-X.
490. Semiz, E.; Ermis, C.; Yalçın, S.; Sancaktar, O.; Deger, N. Comparison of Initial Efficacy and Long-Term Follow-up of Heparin-Coated Jostent With Conventional NIR Stent. *Jpn Heart J* **2003**, *44*, 889–898, doi:10.1536/jhj.44.889.
491. Haude, M.; Konorza, T.F.M.; Kalnins, U.; Erglis, A.; Saunamäki, K.; Glogar, H.D.; Grube, E.; Gil, R.; Serra, A.; Richardt, H.G.; et al. Heparin-Coated Stent Placement for the Treatment of Stenoses in Small Coronary Arteries of Symptomatic Patients. *Circulation* **2003**, *107*, 1265–1270, doi:10.1161/01.CIR.0000053442.64637.34.
492. Finn, A.V.; Nakazawa, G.; Joner, M.; Kolodgie, F.D.; Mont, E.K.; Gold, H.K.; Virmani, R. Vascular Responses to Drug Eluting Stents: Importance of Delayed Healing. *ATVB* **2007**, *27*, 1500–1510, doi:10.1161/ATVBAHA.107.144220.
493. Harper, R.W. Drug-eluting Coronary Stents — a Note of Caution. *Medical Journal of Australia* **2007**, *186*, 253–255, doi:10.5694/j.1326-5377.2007.tb00884.x.
494. Kuchulakanti, P.K.; Chu, W.W.; Torguson, R.; Ohlmann, P.; Rha, S.-W.; Clavijo, L.C.; Kim, S.-W.; Bui, A.; Gevorkian, N.; Xue, Z.; et al. Correlates and Long-Term Outcomes of Angiographically Proven Stent Thrombosis With Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents. *Circulation* **2006**, *113*, 1108–1113, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.600155.
495. McFadden, E.P.; Stabile, E.; Regar, E.; Cheneau, E.; Ong, A.T.L.; Kinnaird, T.; Suddath, W.O.; Weissman, N.J.; Torguson, R.; Kent, K.M.; et al. Late Thrombosis in Drug-Eluting Coronary Stents after Discontinuation of Antiplatelet Therapy. **2004**, *364*.
496. McKeage, K.; Murdoch, D.; Goa, K.L. The Sirolimus-Eluting Stent: A Review of Its Use in the Treatment of Coronary Artery Disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **2003**, *3*, 211–230, doi:10.2165/00129784-200303030-00007.
497. Steffel, J.; Latini, R.A.; Akhmedov, A.; Zimmermann, D.; Zimmerling, P.; Lüscher, T.F.; Tanner, F.C. Rapamycin, but Not FK-506, Increases Endothelial Tissue Factor Expression: Implications for Drug-Eluting Stent Design. *Circulation* **2005**, *112*, 2002–2011, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.569129.
498. Stähli, B.E.; Camici, G.G.; Steffel, J.; Akhmedov, A.; Shojaati, K.; Graber, M.; Lüscher, T.F.; Tanner, F.C. Paclitaxel Enhances Thrombin-Induced Endothelial Tissue Factor Expression via c-Jun Terminal NH₂ Kinase Activation. *Circulation Research* **2006**, *99*, 149–155, doi:10.1161/01.RES.0000233379.92010.fd.
499. Burke, S.E.; Kuntz, R.E.; Schwartz, L.B. Zotarolimus (ABT-578) Eluting Stents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 437–446, doi:10.1016/j.addr.2006.01.021.
500. Bartorelli, A.L.; Trabattini, D.; Fabbicchi, F.; Montorsi, P.; Martini, S.D.; Calligaris, G.; Teruzzi, G.; Galli, S.; Ravagnani, P. Synergy of Passive Coating and Targeted Drug Delivery: The Tacrolimus-Eluting Janus Carbo Stent. *J Intervent Cardiology* **2003**, *16*, 499–505, doi:10.1046/j.1540-8183.2003.01050.x.
501. Berceli, S.A.; Phaneuf, M.D.; LoGerfo, F.W. Evaluation of a Novel Hirudin-Coated Polyester Graft to Physiologic Flow Conditions: Hirudin Bioavailability and Thrombin Uptake. *Journal of Vascular Surgery* **1998**, *27*, 1117–1127, doi:10.1016/S0741-5214(98)70014-X.
502. Alt, E.; Haehnel, I.; Beilharz, C.; Prietzel, K.; Preter, D.; Stemberger, A.; Flidner, T.; Erhardt, W.; Schömig, A. Inhibition of Neointima Formation After Experimental Coronary Artery Stenting: A

- New Biodegradable Stent Coating Releasing Hirudin and the Prostacyclin Analogue Iloprost. *Circulation* **2000**, *101*, 1453–1458, doi:10.1161/01.CIR.101.12.1453.
503. Lahann, J.; Klee, D.; Plueter, W.; Hoecker, H. Bioactive Immobilization of R-Hirudin on CVD-Coated Metallic Implant Devices. *Biomaterials* **2001**, *22*, 817–826, doi:10.1016/S0142-9612(00)00244-1.
504. Liu, X.; Huang, Y.; Hanet, C.; Vandormael, M.; Legrand, V.; Dens, J.; Vandebossche, J.L.; Missault, L.; Vrints, C.; De Scheerder, I. Study of Antirestenosis with the BiodivYsio Dexamethasone-Eluting Stent (STRIDE): A First-in-Human Multicenter Pilot Trial. *Cathet. Cardiovasc. Intervent.* **2003**, *60*, 172–178, doi:10.1002/ccd.10636.
505. Liu, X.; De Scheerder, I.; Desmet, W. Dexamethasone-Eluting Stent: An Anti-Inflammatory Approach to Inhibit Coronary Restenosis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **2004**, *2*, 653–660, doi:10.1586/14779072.2.5.653.
506. Park, Y.M.; Han, S.H.; Lee, K.; Suh, S.Y.; Oh, P.C.; Chung, W.-J.; Kang, W.C.; Koh, K.K.; Ahn, T.H.; Choi, I.S.; et al. Dexamethasone-Eluting Stents Had Sustained Favorable Ischemic Driven Target Lesion Revascularization Rates over 5 Years: A Randomized Controlled Prospective Study. *International Journal of Cardiology* **2013**, *165*, 359–362, doi:10.1016/j.ijcard.2012.08.033.
507. Araujo, C.M. de; Rando, G.A.B.; Mauro, M.F.Z.; Cristóvão, S.A.B.; Sanchez, I.S.M.; Salman, A.A.; Oliveira Neto, J.B. de; Mangione, J.A. [Batimastat-eluting stent implantation for the treatment of coronary artery disease: results of the Brazilian pilot study]. *Arq Bras Cardiol* **2005**, *84*, 256–260, doi:10.1590/s0066-782x2005000300012.
508. Hong, Y.J.; Jeong, M.H. New Drug-Eluting Stents. *Korean Circulation Journal* **2005**, *35*, 197–205.
509. Hong, Y.J.; Jeong, M.H.; Lee, S.R.; Hong, S.N.; Kim, K.H.; Park, H.W.; Kim, J.H.; Kim, W.; Ahn, Y.; Cho, J.G.; et al. Anti-Inflammatory Effect of Abciximab-Coated Stent in a Porcine Coronary Restenosis Model. *J Korean Med Sci* **2007**, *22*, 802–809, doi:10.3346/jkms.2007.22.5.802.
510. Cho, J.Y.; Ahn, Y.; Jeong, M.H. A Bumpy and Winding but Right Path to Domestic Drug-Eluting Coronary Stents. *Korean Circ J* **2013**, *43*, 645, doi:10.4070/kcj.2013.43.10.645.
511. Kim, S.S.; Hong, Y.J.; Jeong, M.H.; Kim, W.; Kim, H.-K.; Ko, J.S.; Lee, M.G.; Sim, D.S.; Park, K.H.; Yoon, N.S.; et al. Two-Year Clinical Outcome After Abciximab-Coated Stent Implantation in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ J* **2010**, *74*, 442–448, doi:10.1253/circj.CJ-09-0674.
512. Ryu, S.K.; Mahmud, E.; Tsimikas, S. Estrogen-Eluting Stents. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **2009**, *2*, 240–244, doi:10.1007/s12265-009-9105-x.
513. Abizaid, A.; Albertal, M.; Costa, M.A.; Abizaid, A.S.; Staico, R.; Feres, F.; Mattos, L.A.; Sousa, A.G.M.R.; Moses, J.; Kipshidze, N.; et al. First Human Experience with the 17-Beta-Estradiol-Eluting Stent. *Journal of the American College of Cardiology* **2004**, *43*, 1118–1121, doi:10.1016/j.jacc.2004.01.023.
514. Adriaenssens, T.; Mehilli, J.; Wessely, R.; Ndrepepa, G.; Seyfarth, M.; Wiecek, A.; Blaich, B.; Iijima, R.; Pache, J.; Kastrati, A.; et al. Does Addition of Estradiol Improve the Efficacy of a Rapamycin-Eluting Stent? *Journal of the American College of Cardiology* **2007**, *49*, 1265–1271, doi:10.1016/j.jacc.2007.02.021.
515. Consigny, P.M. Endothelial Cell Seeding on Prosthetic Surfaces. *J Long Term Eff Med Implants* **2000**, *10*, 79–95, doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.v10.i12.80.
516. Waksman, R. Current State of the Absorbable Metallic (Magnesium) Stent. *EuroIntervention* **2009**, *5 Suppl F*, F94-97, doi:10.4244/EIJV5IFA16.
517. Kipshidze, N.; Dangas, G.; Tsapenko, M.; Moses, J.; Leon, M.B.; Kutryk, M.; Serruys, P. Role of the Endothelium in Modulating Neointimal Formation. *Journal of the American College of Cardiology* **2004**, *44*, 733–739, doi:10.1016/j.jacc.2004.04.048.

518. Anis, R.R. The Future of Drug Eluting Stents. *Heart* **2006**, *92*, 585–588, doi:10.1136/hrt.2005.068288.
519. Pelisek, J.; Fuchs, A.T.; Kuehnl, A.; Tian, W.; Kuhlmann, M.T.; Rolland, P.H.; Mekkaoui, C.; Gaedtke, L.; Nikol, S. C-type Natriuretic Peptide for Reduction of Restenosis: Gene Transfer Is Superior over Single Peptide Administration. *The Journal of Gene Medicine* **2006**, *8*, 835–844, doi:10.1002/jgm.905.
520. Patel, H.J.; Su, S.-H.; Patterson, C.; Nguyen, K.T. A Combined Strategy To Reduce Restenosis for Vascular Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 38–44, doi:10.1021/bp050135e.
521. Cho, H.-J.; Kim, T.-Y.; Cho, H.-J.; Park, K.-W.; Zhang, S.-Y.; Kim, J.-H.; Kim, S.-H.; Hahn, J.-Y.; Kang, H.-J.; Park, Y.-B.; et al. The Effect of Stem Cell Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Neointimal Hyperplasia and Endothelial Healing After Vascular Injury With Bare-Metal Versus Paclitaxel-Eluting Stents. *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *48*, 366–374, doi:10.1016/j.jacc.2005.12.080.
522. Shantsila, E.; Watson, T.; Lip, G.Y.H. Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders. *Journal of the American College of Cardiology* **2007**, *49*, 741–752, doi:10.1016/j.jacc.2006.09.050.
523. Van Belle, E.; Tio, F.O.; Chen, D.; Maillard, L.; Chen, D.; Kearney, M.; Isner, J.M. Passivation of Metallic Stents After Arterial Gene Transfer of phVEGF165 Inhibits Thrombus Formation and Intimal Thickening. *Journal of the American College of Cardiology* **1997**, *29*, 1371–1379, doi:10.1016/S0735-1097(97)00049-1.
524. Shirota, T.; Yasui, H.; Shimokawa, H.; Matsuda, T. Fabrication of Endothelial Progenitor Cell (EPC)-Seeded Intravascular Stent Devices and in Vitro Endothelialization on Hybrid Vascular Tissue. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2295–2302, doi:10.1016/S0142-9612(03)00042-5.
525. Sethi, R.; Lee, C. Endothelial Progenitor Cell Capture Stent: Safety and Effectiveness. *J Intervent Cardiology* **2012**, *25*, 493–500, doi:10.1111/j.1540-8183.2012.00740.x.
526. Van Beusekom, H.M.M.; Ertaş, G.; Sorop, O.; Serruys, P.W.; Van Der Giessen, W.J. The Genous™ Endothelial Progenitor Cell Capture Stent Accelerates Stent Re-endothelialization but Does Not Affect Intimal Hyperplasia in Porcine Coronary Arteries. *Cathet Cardio Intervent* **2012**, *79*, 231–242, doi:10.1002/ccd.22928.
527. Blessing, R.; Ahoopai, M.; Geyer, M.; Brandt, M.; Zeiher, A.M.; Münzel, T.; Wenzel, P.; Gori, T.; Dimitriadis, Z. The Bioengineered Combo Dual-Therapy CD34 Antibody-Covered Sirolimus-Eluting Coronary Stent in Patients with Chronic Total Occlusion Evaluated by Clinical Outcome and Optical Coherence Tomography Imaging Analysis. *JCM* **2020**, *10*, 80, doi:10.3390/jcm10010080.
528. Nakazawa, G.; Granada, J.F.; Alviar, C.L.; Tellez, A.; Kaluza, G.L.; Guilhermier, M.Y.; Parker, S.; Rowland, S.M.; Kolodgie, F.D.; Leon, M.B.; et al. Anti-CD34 Antibodies Immobilized on the Surface of Sirolimus-Eluting Stents Enhance Stent Endothelialization. *JACC: Cardiovascular Interventions* **2010**, *3*, 68–75, doi:10.1016/j.jcin.2009.09.015.
529. Selvakumar, P.P.; Rafuse, M.S.; Johnson, R.; Tan, W. Applying Principles of Regenerative Medicine to Vascular Stent Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 826807, doi:10.3389/fbioe.2022.826807.
530. Takabatake, S.; Hayashi, K.; Nakanishi, C.; Hao, H.; Sakata, K.; Kawashiri, M.; Matsuda, T.; Yamagishi, M. Vascular Endothelial Growth Factor–Bound Stents: Application of In Situ Capture Technology of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Porcine Coronary Model. *J Intervent Cardiology* **2014**, *27*, 63–72, doi:10.1111/joic.12087.
531. Van Belle, E.; Maillard, L.; Tio, F.O.; Isner, J.M. Accelerated Endothelialization by Local Delivery of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor Reduces In-Stent Intimal

- Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *235*, 311–316, doi:10.1006/bbrc.1997.6772.
532. Swanson, N.; Hogrefe, K.; Javed, Q.; Malik, N.; Gershlick, A.H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Eluting Stents: In Vivo Effects on Thrombosis, Endothelialization and Intimal Hyperplasia. *J Invasive Cardiol* **2003**, *15*, 688–692.
533. Kern, A.; Mangin, P. Critical Analysis of in Vitro and Ex Vivo Experimental Models Investigating the Intrinsic Thrombogenicity of Clinically-Used Stents. In *European Symposium on Vascular Biomaterial Congress Book*; 2023; pp. 92–103.
534. Chandler, A.B. In Vitro Thrombotic Coagulation of the Blood; a Method for Producing a Thrombus. *Lab Invest* **1958**, *7*, 110–114.
535. Tepe, G.; Schmehl, J.; P Wendel, H.; Schaffner, S.; Heller, S.; Gianotti, M.; D Claussen, C.; H Duda, S. Reduced Thrombogenicity of Nitinol Stents—In Vitro Evaluation of Different Surface Modifications and Coatings. *Biomaterials* **2006**, *27*, 643–650, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.004.
536. Sinn, S.; Scheuermann, T.; Deichelbohrer, S.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. A Novel in Vitro Model for Preclinical Testing of the Hemocompatibility of Intravascular Stents According to ISO 10993-4. *J Mater Sci: Mater Med* **2011**, *22*, 1521–1528, doi:10.1007/s10856-011-4335-2.
537. Lenz-Habijan, T.; Brodde, M.; Kehrel, B.E.; Bannewitz, C.; Gromann, K.; Bhogal, P.; Aguilar Perez, M.; Monstadt, H.; Henkes, H. Comparison of the Thrombogenicity of a Bare and Antithrombogenic Coated Flow Diverter in an In Vitro Flow Model. *Cardiovasc Intervent Radiol* **2020**, *43*, 140–146, doi:10.1007/s00270-019-02307-5.
538. Chin-Quee, S.L.; Hsu, S.H.; Nguyen-Ehrenreich, K.L.; Tai, J.T.; Abraham, G.M.; Pacetti, S.D.; Chan, Y.F.; Nakazawa, G.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R.; et al. Endothelial Cell Recovery, Acute Thrombogenicity, and Monocyte Adhesion and Activation on Fluorinated Copolymer and Phosphorylcholine Polymer Stent Coatings. *Biomaterials* **2010**, *31*, 648–657, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.079.
539. Schmehl, J.M.; Harder, C.; Wendel, H.P.; Claussen, C.D.; Tepe, G. Silicon Carbide Coating of Nitinol Stents to Increase Antithrombogenic Properties and Reduce Nickel Release. *Cardiovascular Revascularization Medicine* **2008**, *9*, 255–262, doi:10.1016/j.carrev.2008.03.004.
540. Tepe, G.; Wendel, H.P.; Khorchidi, S.; Schmehl, J.; Wiskirchen, J.; Pusich, B.; Claussen, C.D.; Duda, S.H. Thrombogenicity of Various Endovascular Stent Types: An In Vitro Evaluation. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* **2002**, *13*, 1029–1035, doi:10.1016/S1051-0443(07)61868-5.
541. Walter, T.; Rey, K.S.; Wendel, H.P.; Szabo, S.; Suselbeck, T.; Dempfle, C.-E.; Borggrefe, M.; Swoboda, S.; Beyer, M.E.; Hoffmeister, H.M. Thrombogenicity of Sirolimus-Eluting Stents and Bare Metal Stents: Evaluation in the Early Phase after Stent Implantation. *in vivo* **2010**, *5*.
542. Sakariassen, K.S.; Aarts, P.A.; de Groot, P.G.; Houdijk, W.P.; Sixma, J.J. A Perfusion Chamber Developed to Investigate Platelet Interaction in Flowing Blood with Human Vessel Wall Cells, Their Extracellular Matrix, and Purified Components. *Lab J Clin Med* **1983**, *102*, 522–535.
543. Beythien, C.; Terres, W.; Hamm, C.W. In Vitro Model to Test the Thrombogenicity of Coronary Stents. *Thrombosis Research* **1994**, *75*, 581–590, doi:10.1016/0049-3848(94)90170-8.
544. Jaryl Ng, C.K.J.; Paradies, V.; Vlachoianis, G.J.; Toh, H.W.; Leo, H.L.; Wong, E.H.P.; Foin, N.; Ang, H.Y. Provisional Stenting for the Treatment of Bifurcation Lesions: In Vitro Insights. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **2021**, *14*, 595–597, doi:10.1007/s12265-020-10088-3.

545. Lu, S.; Ng, J.; Ang, H.; Paradies, V.; Wong, P.E.; Al-Lamee, R.; Al-Lamee, K.; Bullett, N.; Ahmed, N.; Joner, M.; et al. Is There Light at the End of the Thin-Strut Tunnel? *JACC: Cardiovascular Interventions* **2018**, *11*, 714–716, doi:10.1016/j.jcin.2018.01.237.
546. Krajewski, S.; Neumann, B.; Kurz, J.; Perle, N.; Avci-Adali, M.; Cattaneo, G.; Wendel, H.P. Preclinical Evaluation of the Thrombogenicity and Endothelialization of Bare Metal and Surface-Coated Neurovascular Stents. *American Journal of Neuroradiology* **2015**, *36*, 133–139, doi:10.3174/ajnr.A4109.
547. Paradies, V.; Ng, J.; Lu, S.; Bulluck, H.; Burzotta, F.; Chieffo, A.; Ferenc, M.; Wong, P.E.; Hausenloy, D.J.; Foin, N.; et al. T and Small Protrusion (TAP) vs Double-Kissing Crush Technique: Insights From In Vitro Models. *Cardiovascular Revascularization Medicine* **2021**, *24*, 11–17, doi:10.1016/j.carrev.2020.09.013.
548. Perry-Nguyen, D.; Jung, R.G.; Labinaz, A.; Duchez, A.-C.; Dewidar, O.; Simard, T.; Karunakaran, D.; Majeed, K.; Sarathy, K.; Li, R.; et al. Evaluation of an *in Vitro* Coronary Stent Thrombosis Model for Preclinical Assessment. *Platelets* **2020**, *31*, 167–173, doi:10.1080/09537104.2019.1595564.
549. Eppihimer, M.J.; Sushkova, N.; Grimsby, J.L.; Efimova, N.; Kai, W.; Larson, S.; Forsyth, B.; Huibregtse, B.A.; Dawkins, K.D.; Wilson, G.J.; et al. Impact of Stent Surface on Thrombogenicity and Vascular Healing: A Comparative Analysis of Metallic and Polymeric Surfaces. *Circ: Cardiovascular Interventions* **2013**, *6*, 370–377, doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000120.
550. Marcus, J.T.; Smeenk, H.G.; Kuijter, J.P.A.; Van der Geest, R.J.; Heethaar, R.M.; Van Rossum, A.C. Flow Profiles in the Left Anterior Descending and the Right Coronary Artery Assessed by MR Velocity Quantification: Effects of Through-Plane and In-Plane Motion of the Heart. *Journal of Computer Assisted Tomography* **1999**, *23*, 567.
551. Gasior, P.; Lu, S.; Ng, C.K.J.; Toong, W.Y.D.; Wong, E.H.P.; Foin, N.; Kedhi, E.; Wojakowski, W.; Ang, H.Y. Comparison of Overexpansion Capabilities and Thrombogenicity at the Side Branch Ostia after Implantation of Four Different Drug Eluting Stents. *Sci Rep* **2020**, *10*, 20791, doi:10.1038/s41598-020-75836-6.
552. Engels, G.E.; Blok, S.L.J.; van Oeveren, W. *In Vitro* Blood Flow Model with Physiological Wall Shear Stress for Hemocompatibility Testing—An Example of Coronary Stent Testing. *Biointerphases* **2016**, *11*, 031004, doi:10.1116/1.4958979.
553. Johnson, K.; Sharma, P.; Oshinski, J. Coronary Artery Flow Measurement Using Navigator Echo Gated Phase Contrast Magnetic Resonance Velocity Mapping at 3.0T. *Journal of Biomechanics* **2008**, *41*, 595–602, doi:10.1016/j.jbiomech.2007.10.010.
554. Sperling, C.; Waliszewski, M.W.; Kherad, B.; Krackhardt, F. Comparative Preclinical Evaluation of a Polymer-Free Sirolimus-Eluting Stent in Porcine Coronary Arteries. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* **2019**, *13*, 175394471982633, doi:10.1177/1753944719826335.
555. Quinton, W.; Dillard, D.; Scribner, B.H. Cannulation of Blood Vessels for Prolonged Hemodialysis. *Hemodialysis International* **2004**, *8*, 6–9, doi:10.1111/j.1492-7535.2004.00080.x.
556. Otsuka, F.; Cheng, Q.; Yahagi, K.; Acampado, E.; Sheehy, A.; Yazdani, S.K.; Sakakura, K.; Euler, K.; Perkins, L.E.L.; Kolodgie, F.D.; et al. Acute Thrombogenicity of a Durable Polymer Everolimus-Eluting Stent Relative to Contemporary Drug-Eluting Stents With Biodegradable Polymer Coatings Assessed Ex Vivo in a Swine Shunt Model. *JACC: Cardiovascular Interventions* **2015**, *8*, 1248–1260, doi:10.1016/j.jcin.2015.03.029.
557. Waksman, R.; Lipinski, M.J.; Acampado, E.; Cheng, Q.; Adams, L.; Torii, S.; Gai, J.; Torguson, R.; Hellings, D.M.; Westman, P.C.; et al. Comparison of Acute Thrombogenicity for Metallic and Polymeric Bioabsorbable Scaffolds: Magmaris Versus Absorb in a Porcine Arteriovenous Shunt Model. *Circ: Cardiovascular Interventions* **2017**, *10*, e004762, doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.116.004762.

558. Lipinski, M.J.; Acampado, E.; Cheng, Q.; Adams, L.; Torii, S.; Gai, J.; Torguson, R.; Hellinga, D.G.; Joner, M.; Harder, C.; et al. Comparison of Acute Thrombogenicity for Magnesium versus Stainless Steel Stents in a Porcine Arteriovenous Shunt Model. *EuroIntervention* **2019**, *14*, 1420–1427, doi:10.4244/EIJ-D-17-00958.
559. Jinnouchi, H.; Sato, Y.; Cheng, Q.; Janifer, C.; Kutyna, M.; Cornelissen, A.; Wijeratne, R.; Sakamoto, A.; Guo, L.; Kolodgie, F.D.; et al. Thromboresistance and Endothelial Healing in Polymer-Coated versus Polymer-Free Drug-Eluting Stents: Implications for Short-Term Dual Anti-Platelet Therapy. *International Journal of Cardiology* **2021**, *327*, 52–57, doi:10.1016/j.ijcard.2020.11.030.
560. De Scheerder, I.; Verbeken, E.; Van Humbeeck, J. Metallic Surface Modification. **1998**, *3*, 139–144.
561. Dan, K.; Garcia-Garcia, H.M.; Shlofmitz, E.; Okamura, T.; Kuku, K.O.; Hellinga, D.; Kolodgie, F.D.; Hideo-Kajita, A.; Desale, S.; Waksman, R. Feasibility of a Porcine Arteriovenous Shunt Model for Assessment of Acute Thrombogenicity in Bifurcation Stenting Technique By Optical Coherence Tomography. *Cardiovascular Revascularization Medicine* **2020**, *21*, 1000–1005, doi:10.1016/j.carrev.2018.12.025.
562. Dan, K.; Bhogal, S.; Kuku, K.O.; Melaku, G.D.; Devineni, A.; Hellinga, D.; Waksman, R.; Garcia-Garcia, H.M. Optical Coherence Tomography Assessment of Acute Thrombogenicity at Bifurcation Sites Using Different Stenting Techniques: A Porcine Arteriovenous Shunt Study. *Catheter Cardiovasc Interv* **2022**, *99*, 1998–2005, doi:10.1002/ccd.30187.
563. Torrado, J.; Buckley, L.; Durán, A.; Trujillo, P.; Toldo, S.; Valle Raleigh, J.; Abbate, A.; Biondi-Zoccai, G.; Guzmán, L.A. Restenosis, Stent Thrombosis, and Bleeding Complications. *Journal of the American College of Cardiology* **2018**, *71*, 1676–1695, doi:10.1016/j.jacc.2018.02.023.
564. Cutlip, D.E.; Baim, D.S.; Ho, K.K.L.; Popma, J.J.; Lansky, A.J.; Cohen, D.J.; Carrozza, J.P.; Chauhan, M.S.; Rodriguez, O.; Kuntz, R.E. Stent Thrombosis in the Modern Era. *Circulation* **2001**, *103*, 1967–1971, doi:10.1161/01.cir.103.15.1967.
565. Grove, E.C.L.; Kristensen, S.D. Stent Thrombosis: Definitions, Mechanisms and Prevention. *ESC Council for Cardiology Practice* **2007**, *5*.
566. Moussa, I.; Mario, C.D.; Francesco, L.D.; Reimers, B.; Blengino, S.; Colombo, A. Subacute Stent Thrombosis and the Anticoagulation Controversy: Changes in Drug Therapy, Operator Technique and the Impact of Intravascular Ultrasound. *American Journal of Cardiology* **1996**, *78*, 13–17, doi:10.1016/s0002-9149(96)00486-9.
567. Ullrich, H.; Münzel, T.; Gori, T. Coronary Stent Thrombosis — Predictors and Prevention. *Deutsches Ärzteblatt international* **2020**, doi:10.3238/arztebl.2020.0320.
568. Cutlip, D.E.; Windecker, S.; Mehran, R.; Boam, A.; Cohen, D.J.; van Es, G.-A.; Gabriel Steg, P.; Morel, M.; Mauri, L.; Vranckx, P.; et al. Clinical End Points in Coronary Stent Trials: A Case for Standardized Definitions. *Circulation* **2007**, *115*, 2344–2351, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.685313.
569. Kirtane, A.J.; Stone, G.W. How to Minimize Stent Thrombosis. *Circulation* **2011**, *124*, 1283–1287, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.976829.
570. Lim, S.; Hong, S.J.; Kim, J.H.; Cha, J.-J.; Joo, H.J.; Park, J.H.; Yu, C.W.; Kim, B.-K.; Chang, K.; Park, Y.; et al. High Platelet Reactivity Strongly Predicts Early Stent Thrombosis in Patients with Drug-Eluting Stent Implantation. *Sci Rep* **2024**, *14*, 520, doi:10.1038/s41598-023-50920-9.
571. Nakazawa, G. Stent Thrombosis of Drug Eluting Stent: Pathological Perspective. *Journal of Cardiology* **2011**, *58*, 84–91, doi:10.1016/j.jjcc.2011.07.004.
572. Prati, F.; Kodama, T.; Romagnoli, E.; Gatto, L.; Di Vito, L.; Ramazzotti, V.; Chisari, A.; Marco, V.; Cremonesi, A.; Parodi, G.; et al. Suboptimal Stent Deployment Is Associated with Subacute Stent

- Thrombosis: Optical Coherence Tomography Insights from a Multicenter Matched Study. From the CLI Foundation Investigators: The CLI-THRO Study. *American Heart Journal* **2015**, *169*, 249–256, doi:10.1016/j.ahj.2014.11.012.
573. Motovska, Z.; Knot, J.; Widimsky, P. REVIEW: Stent Thrombosis—Risk Assessment and Prevention. *Cardiovascular Therapeutics* **2010**, *28*, doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00186.x.
574. Iakovou, I.; Schmidt, T.; Bonizzoni, E.; Ge, L.; Sangiorgi, G.M.; Stankovic, G.; Airolidi, F.; Chieffo, A.; Montorfano, M.; Carlino, M.; et al. Incidence, Predictors, and Outcome of Thrombosis after Successful Implantation of Drug-Eluting Stents. *JAMA* **2005**, *293*, 2126–2130, doi:10.1001/jama.293.17.2126.
575. Van Werkum, J.W.; Heestermaans, A.A.; Zomer, A.C.; Kelder, J.C.; Suttrop, M.-J.; Rensing, B.J.; Koolen, J.J.; Brueren, B.R.G.; Dambrink, J.-H.E.; Hautvast, R.W.; et al. Predictors of Coronary Stent Thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *53*, 1399–1409, doi:10.1016/j.jacc.2008.12.055.
576. Buonamici, P.; Marcucci, R.; Migliorini, A.; Gensini, G.F.; Santini, A.; Paniccia, R.; Moschi, G.; Gori, A.M.; Abbate, R.; Antoniucci, D. Impact of Platelet Reactivity After Clopidogrel Administration on Drug-Eluting Stent Thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* **2007**, *49*, 2312–2317, doi:10.1016/j.jacc.2007.01.094.
577. Otsuka, F.; Nakano, M.; Ladich, E.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R. Pathologic Etiologies of Late and Very Late Stent Thrombosis Following First-Generation Drug-Eluting Stent Placement. *Thrombosis* **2012**, *2012*, 1–16, doi:10.1155/2012/608593.
578. Baron, T.H.; Kamath, P.S.; McBane, R.D. Management of Antithrombotic Therapy in Patients Undergoing Invasive Procedures. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 2113–2124, doi:10.1056/NEJMra1206531.
579. Pop, R.; Zinchenko, I.; Quenardelle, V.; Mihoc, D.; Manisor, M.; Richter, J.S.; Severac, F.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Rouyer, O.; et al. Predictors and Clinical Impact of Delayed Stent Thrombosis after Thrombectomy for Acute Stroke with Tandem Lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* **2019**, ajnr;ajnr.A5976v1, doi:10.3174/ajnr.A5976.
580. Guildford, A.; Santin, M.; Phillips, G.J. Cardiovascular Stents. In *Biomaterials and Devices for the Circulatory System*; Elsevier, 2010; pp. 173–216 ISBN 978-1-84569-464-7.
581. Ge, J.; Yu, H.; Li, J. Acute Coronary Stent Thrombosis in Modern Era: Etiology, Treatment, and Prognosis. *Cardiology* **2017**, *137*, 246–255, doi:10.1159/000464404.
582. Pop, R.; Hasiu, A.; Mangin, P.H.; Severac, F.; Mihoc, D.; Nistoran, D.; Manisor, M.; Simu, M.; Chibbaro, S.; Gheoca, R.; et al. Postprocedural Antiplatelet Treatment after Emergent Carotid Stenting in Tandem Lesions Stroke: Impact on Stent Patency beyond Day 1. *AJNR Am J Neuroradiol* **2021**, *42*, 921–925, doi:10.3174/ajnr.A6993.
583. Hechler, B.; Dupuis, A.; Mangin, P.H.; Gachet, C. Platelet Preparation for Function Testing in the Laboratory and Clinic: Historical and Practical Aspects. *Res Pract Thromb Haemost* **2019**, *3*, 615–625, doi:10.1002/rth2.12240.
584. Massberg, S.; Konrad, I.; Bültmann, A.; Schulz, C.; Münch, G.; Peluso, M.; Lorenz, M.; Schneider, S.; Besta, F.; Müller, I.; et al. Soluble Glycoprotein VI Dimer Inhibits Platelet Adhesion and Aggregation to the Injured Vessel Wall in Vivo. *FASEB j.* **2004**, *18*, 1–18, doi:10.1096/fj.03-0464fje.
585. Lebozec, K.; Jandrot-Perrus, M.; Avenard, G.; Favre-Bulle, O.; Billiald, P. Design, Development and Characterization of ACT017, a Humanized Fab That Blocks Platelet's Glycoprotein VI Function without Causing Bleeding Risks. *mAbs* **2017**, *9*, 945–958, doi:10.1080/19420862.2017.1336592.

586. Coelho, A.P.; Lobo, M.; Nogueira, C.; Gouveia, R.; Campos, J.; Augusto, R.; Coelho, N.; Semião, A.C.; Canedo, A. Overview of Evidence on Risk Factors and Early Management of Acute Carotid Stent Thrombosis during the Last Two Decades. *Journal of Vascular Surgery* **2019**, *69*, 952–964, doi:10.1016/j.jvs.2018.09.053.

La thrombose de stent : évaluation de l'importance de la rhéologie dans la thrombogénicité des stents et d'un nouvel agent pharmacologique dirigé contre la GPVI pour prévenir la thrombose de stent

Une complication majeure de la pose d'un stent sur une plaque d'athérosclérose est la thrombose de stent, qui présente un taux de mortalité particulièrement élevé. La bithérapie antiplaquettaire, indiquée dans la prévention de cette complication, entraîne un risque important de saignement et n'est pas toujours efficace. L'objectif de ce travail de thèse a consisté à identifier les mécanismes de la thrombose de stent et à évaluer l'intérêt d'une nouvelle classe d'agents antiplaquettaires capables de la prévenir efficacement avec un risque hémorragique faible. Le développement d'un modèle macrofluidique original a permis de montrer que les stents carotidiens utilisés en clinique possèdent une thrombogénicité intrinsèque d'une part au niveau de la bifurcation, dans la lumière du vaisseau, et d'autre part au niveau des mailles en contact avec la paroi du vaisseau. Le dispositif a également mis en lumière un effet protecteur des mailles du stent sur la thrombose de stent. Enfin, le modèle a montré que le glenzocimab, un agent anti-GPVI, est aussi efficace dans la prévention de la thrombose de stent que les traitements de référence, mais sans risque de saignements.

Mots clés : plaquettes, thrombose de stent, athérosclérose, GPVI, glenzocimab, macrofluidie

Stent thrombosis: evaluation of the importance of rheology in stent thrombogenicity and of a novel pharmacological agent directed against GPVI to prevent stent thrombosis

A major complication of stenting in a diseased artery is stent thrombosis, which has a particularly high mortality rate. Dual antiplatelet therapy, indicated to prevent this complication, possesses a high risk of bleeding and is not always effective. The aim of my PhD was to identify the mechanisms of stent thrombosis and to evaluate the interest of a new class of antiplatelet agents to efficiently prevent it with a low bleeding risk. The development of an original macrofluidic model has enabled us to show that the carotid stents used in clinical practice present an intrinsic thrombogenicity evidenced both at the bifurcation of a vessel where the stent meshes lie in the lumen, and around some specific places of the stent struts which are in contact with the vessel wall. The device also helped to identify a protective effect of the stent mesh, which reduces stent thrombosis. Finally, the model showed that glenzocimab, an anti-GPVI agent, is effective in preventing stent thrombosis to a similar extent than reference treatments, but with no bleeding risk.

Key words: platelets, stent thrombosis, atherosclerosis, GPVI, glenzocimab, macrofluidic model