

**ÉCOLE DOCTORALE de PHYSIQUE et CHIMIE-PHYSIQUE**  
Laboratoire Biomatériaux et Bioingénierie UMR\_S 1121

## THÈSE

 présentée par :

**Isabelle TALON**

soutenue le : **02 Juillet 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**  
Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique

CONTRIBUTIONS A L'AMELIORATION ET L'ELABORATION DE  
BIOMATERIAUX DEDIES A LA HERNIE DIAPHRAGMATIQUE  
CONGENITALE

**THÈSE dirigée par :**

**Mr HEMMERLÉ Joseph**  
**Mr FRISCH Benoît**

Docteur, université de Strasbourg  
Docteur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr FOURCADE Laurent**  
**Mr BREAUD Jean**

Professeur des Universités, Université de Limoge  
Professeur des Universités, Université de Nice

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr SCHLATTER Guy**  
**Mme AUBRY Estelle**

Professeur, Université de Strasbourg  
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalo-Universitaire de Lille

## **Remerciements**

**A notre jury de thèse,**

**Monsieur Joseph Hemmerlé**, *la plus belle trouvaille de ma recherche ! Anne m'avait promis une belle personne et je connais la qualité de son jugement. Merci de m'avoir portée et supportée durant 3 ans. Au-delà de ton accompagnement et soutien tout au long de ce travail, c'est l'immensité de ton savoir et de ta bienveillance que je retiendrai, nos pauses « papotte » sur tout et rien accompagnées parfois d'un peu d'hydratation... ! Je sais que de nombreuses personnes regrettent comme moi que tu raccroches la blouse et tes domaines d'expertises se retrouvent amputés d'un de leur leader mais je sais aussi combien tu sauras mettre à profit cette nouvelle vie et nous comptons tous sur toi pour accomplir l'une de tes passions, l'apiculture, et ainsi continuer à apporter aux autres. Bonne continuation à toi... et ne change pas de portable, quelques conseils me seront toujours nécessaires...*

**Monsieur Benoit Frisch**, *je te suis reconnaissante d'avoir co dirigé ce travail et d'avoir apporté par tes connaissances un regard complémentaire et constructif sur celui-ci. Soit assuré de ma sincère gratitude. Je sais à quel point la vie n'est pas un long fleuve tranquille, et j'espère de tout cœur que la médecine saura apaiser tes difficultés actuelles.*

**Monsieur le Professeur Jean Bréaud**, *tu as accepté immédiatement d'être rapporteur de ce travail avec enthousiasme comme à ton habitude mais aussi avec toute ton expérience et tes qualités humaines. C'est pour moi l'occasion de te témoigner ma reconnaissance, mon amitié. Si un jour je deviens PUPH, saches que j'aimerais l'être à ta manière, à l'écoute de tous et bienveillant envers tes patients, leurs familles et tes collègues. Merci d'être là aujourd'hui.*

**Monsieur le Professeur Laurent Fourcade**, *tu as accepté d'être rapporteur de ce travail bien que les contraintes professionnelles soient actuellement démesurées et je t'en suis très reconnaissante. Merci pour ton enthousiasme, c'est un plaisir et un honneur pour moi de te savoir rapporteur de ce travail.*

**Madame le docteur Estelle Aubry**, *tu as tout de suite répondu présente pour juger de mon travail et je t'en remercie chaleureusement. Nous avons navigué ensemble sur les eaux de la chirurgie pédiatrique française, traversées toutes deux des périodes sans vent et des tempêtes. Mais je sais que quoi qu'il advienne, le capitaine que tu es mène son embarcation à bon port et toujours avec dynamisme, positivisme et sympathie ! merci d'être là aujourd'hui.*

**Monsieur le Professeur Guy Schlatter**, vous avez rejoint ce projet avec enthousiasme et votre expertise a redonné un souffle à nos travaux et nos motivations. Je suis honorée de votre (ta !) présence parmi nous aujourd'hui et pour la suite de l'aventure !

A toute l'équipe de l'INSERM UMR\_S 1121 et son directeur, Monsieur Pierre Schaaf, pour m'avoir tous accueilli parmi vous malgré ma disponibilité aléatoire ! Un grand merci tout particulièrement à : Eric Mathieu bien sûr, sans qui cette thèse ne pourrait être aussi aboutie aujourd'hui, pour la qualité de son travail, son partenariat indéfectible ; à Vincent Ball, pour son expertise et son enthousiasme, son dynamisme... là aussi, je garde ton portable car j'espère bien que nos échanges se poursuivront et j'ai bien conscience d'avoir besoin encore longtemps de tes compétences ; à Dominique Vautier pour son accueil chaleureux et son aide précieuse ; à Abdu à qui je souhaite un beau parcours professionnel quelque part sur le globe.

A toute l'équipe du CNRS UMR 7199, et tout particulièrement à Cendrine Seguin, qui a cru d'emblée à ce sujet et s'est investi avec enthousiasme et intérêt dans ce projet et sans qui là aussi, ce travail n'aurait pas pu être aussi abouti aujourd'hui, ... Merci de m'avoir montré des myocytes en pleine séance de sport dans une boîte de pétri !!! A refaire !

A l'équipe de Guy, et particulièrement Anne et Rodolphe qui nous ont accompagnés et nous accompagnent encore dans ce beau projet. Je suis ravie de poursuivre cette collaboration.

A Nadia Bahlouli et son équipe pour son expertise dans le domaine mécanique et avec qui nous poursuivons là encore ce travail avec plaisir.

A Anne Schneider bien sûr, sans qui rien de tout cela ne serait. J'étais ravie de partager ce bureau avec toi au Leriche. J'ai pu te découvrir un peu plus et apprécier ta rigueur professionnelle et ta bienveillance. Je connaissais le chirurgien calme et posé, j'ai découvert le chercheur volontaire et accroché. Nos caractères sont bien différents on l'a vu ces derniers temps mais complémentaires je crois et je n'ai qu'un vœu, que nous continuions à faire chemin ensemble.

A monsieur le Professeur François Becmeur. Votre passion pour la chirurgie pédiatrique et tout ce qu'elle transporte d'humanisme et de bienveillance a poussée mon admiration et m'a amené à poser mes valises dans votre service. Je ne vous en remercierai jamais assez. Telle la relation d'un enfant entrant dans l'âge de l'adolecence et défiant ses parents, la notre a subi quelques écorchures ces derniers temps mais rien n'effacera jamais la reconnaissance que je vous dois, le respect de l'Homme de l'art incontestable et incontesté et quelque part la tendresse pour mon père. Merci, sincèrement.

Un grand merci à tant de personnes, mes collègues et amis médecins ou para médicaux, qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce travail, tantôt par leur participation active, tantôt par un encouragement, un soutien organisationnel :

- A mes victimes de vampirisation, Isabelle et Claire
- A mes complices dans ce vice, les préleveurs : Claire, Chloé, Corinne
- Au personnel du bloc qui m'a supporté, aidé, qui a joué de bonne volonté aux coursiers et plus particulièrement... Alain, Régis, Catherine, et « la chef », Corinne
- A Madame Julie Scholler, pharmacien aux HUS, qui m'a permis de stériliser nos échantillons, toujours volontiers et gentiment, quelque soit les impératifs autres, les déménagements et bouleversements « hautepierriens » ! Un grand merci !

Merci à FIMATHO et toute leur équipe qui croit en notre projet et soutient notre projet. C'est une équipe médicale, paramédicale et administrative incroyable, d'une grande disponibilité et efficacité qui porte les maladies rares avec passion et c'est pour moi l'occasion de les féliciter et de les remercier de la part de nos petits patients. Merci également à la FMR qui elle aussi croit en notre projet et nous aide à comprendre et franchir les barrières du monde industriel.

*A toi, Papa, je suis certaine que tu me surveilles et j'espère que tu es fier de moi, j'aurais tout donner pour que tu sois là aujourd'hui. Tu me manques terriblement.*

*A toi, Maman, je sais que pour toi aussi cette thèse est une joie et une douleur. Merci de supporter mes humeurs particulièrement labiles en ces moments difficiles.*

*A mes 2 mousquetaires de grand frère et grande sœur, Jean-Marc et Anne ainsi qu'à leur jolie famille respectives. T'inquiètes doky, y aura toujours qu'un doky !*

*Aux amours de ma vie, la prunelle de mes yeux, le sel de la vie, Julie, Clément, vous êtes ce que j'ai de plus beau. Je suis si fière de vous.*

*Just for a blue dream...*

## Résumé en français

La hernie diaphragmatique congénitale se définit par la présence d'un défaut postérolatéral du muscle diaphragmatique. Sa prise en charge est chirurgicale par interposition d'une prothèse dans les formes les plus graves. La prothèse idéale n'existe pas et nous l'avons prouvé par l'analyse d'explants montrant une colonisation non satisfaisante. De même les tests mécaniques réalisés sur les prothèses les plus couramment utilisées montrent des propriétés inadaptées dans cette indication. Nous avons pu développer deux axes prometteurs :

- La fonctionnalisation par la polydopamine du Tétrafluoroéthylène expansé améliore les propriétés biologiques de la prothèse sans altérer sa structure.

- Nous avons su développer un matériau innovant, biface dont les propriétés mécaniques répondent au cahier des charges d'une prothèse diaphragmatique implantée en période néonatale par une meilleure élasticité. Par ailleurs, les premiers tests in vitro montrent une colonisation importante du matériau in vitro avec une meilleure adhésion cellulaire au sein de sa trame.

Ces éléments nous poussent à poursuivre les investigations vers des tests complémentaires pour aller vers un matériau brevetable.

## Résumé en anglais

Congenital diaphragmatic hernia is defined by the presence of posterolateral dysfunction of the diaphragmatic muscle. Its management is surgical by interposition of a prosthesis in the most serious forms. The ideal prosthesis does not exist and we have proved it by explant analysis showing unsatisfactory colonization. Similarly, the mechanical tests performed on the most commonly used prostheses show properties that are unsuitable for this indication. We have been able to develop two promising areas:

The functionalization with polydopamine of expanded tetrafluoroethylene improves the biological properties of the prosthesis without altering its structure.

We have developed an innovative material, whose mechanical properties meet the specifications of a diaphragmatic prosthesis implanted in the neonatal period by a better elasticity. In addition, the first in vitro tests show a significant colonization of the material in vitro with better cell adhesion within its frame.

These elements push us to continue the investigations towards additional tests to go towards a patentable material. Mots Clés : diaphragmatic hernia, e-PTFE, polydopamine, TPU

## Table des matières

Liste des abréviations	9
Liste des figures	12
Liste des tableaux	24
Liste des annexes : publications	25
INTRODUCTION GENERALE	26
1) CONTEXTE DANS LEQUEL S'INSCRIT LA RECHERCHE	28
a) La Hernie Diaphragmatique Congenitale (HDC)	28
i) Rappels et Définition	28
ii) Prise en charge des HDC	34
(1) Prise en charge anténatale	34
(2) Prise en charge post natale	36
b) Etat des lieux sur les prothèses dans la prise en charge des hernies diaphragmatiques congénitales	44
i) Le polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE, Trademark, Gore-Tex®)	44
ii) Les autres prothèses et travaux de recherche	45
2) DEFINITION DU CAHIER DES CHARGES D'UNE PROTHESE OPTIMALE	49
a) Analyse du e-PTFE natif	49
i) Analyse ultrastructurale	49
(1) Calcul de l'angle de contact	49
(2) Analyse en microscopie électronique à balayage (MEB)	50
(3) Analyse en microscopie à force atomique (AFM)	53
ii) Analyse biomécanique	55
(1) Test de traction unidirectionnel	55
(2) Test de traction sous MEB	60
b) Analyse d'explants	64
i) Analyse au microscope photonique	65
ii) Analyse au MEB	69
iii) Analyse au MET	79
iv) Analyse à l'AFM	83
v) Synthèse des résultats	84
c) Cahier des charges	86
i) Données bibliographiques	86
ii) Les conclusions principales de nos analyses	90
iii) Attentes d'une prothèse optimale	91
3) LES DEUX AXES DU TRAVAIL DE THESE	92

4) FONCTIONNALISATIONS du e-PTFE	93
a) Procédés de fonctionnalisation chimique avec la polydopamine (PDA)	93
i) Rappels sur les propriétés de la PDA	93
ii) Deux méthodes de fonctionnalisation du e-PTFE par la PDA	94
(1) Imprégnation avec la PDA du e-PTFE	94
(2) Dépôt d'un film de PDA sur du e-PTFE	96
iii) Analyse du e-PTFE fonctionnalisé par la PDA	97
(1) Mesure d'angle de contact	97
(2) Analyses en microscopie : MO, MEB, MET et AFM	98
(3) Analyse de l'impact en termes de viabilité cellulaire et de réaction immunologique en présence de e-PTFE fonctionnalisé	104
(4) Analyse de la réponse cellulaire	112
b) Fonctionnalisation avec des membranes de « Platelet Rich Fibrin » (PRF)	116
i) Rappels sur le PRF	117
(1) Historique	117
(2) Rôle et impact de la centrifugation	118
(3) Modalités d'obtention du PRF	120
(4) Composition du PRF	121
ii) Analyses des PRF	127
(1) Modalités d'obtention du PRF pour notre protocole	127
(2) Analyse en fonction de la compression	129
(3) Analyse en fonction de la vitesse de centrifugation et de la zone d'intérêt	132
c) Analyse de l'interaction PRF-PDA	135
i) Analyses structurales	135
ii) Viabilité cellulaire et marqueurs d'inflammation	140
d) Conclusions et perspectives	142
5) MISE AU POINT D'UN BIOMATERIAU INNOVANT	144
a) Choix du matériau et de la technique de fabrication	144
i) Le Polyuréthane thermoplastique (TPU)	144
ii) Choix de l'électrofilage	146
b) Protocoles de fabrication des membranes électrofilées	150
c) Obtention d'une membrane biface	154
d) Données mécanistiques des membranes de TPU bifaces	157
i) Mesure de l'angle de contact	157
ii) Test de traction uniaxial	157
iii) Test de traction sous MEB	159
iv) Analyse en AFM	164
e) Données biologiques	166
i) Analyse de la viabilité cellulaire et des réactions immunologiques	166
ii) Analyse de la réponse cellulaire	169
(1) Evaluation <i>in vitro</i> sur des lignées cellulaires murines	170
(2) Evaluation <i>in vitro</i> sur des lignées cellulaires humaines	176
f) Conclusions et perspectives	180
CONCLUSION GENERALE	181
Références	185

## Liste des abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFM :	Atomic Force Microscope
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
CPDPN :	Comité Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal
CPP :	Comité de Protection des Personnes
DMAE :	DiMethylAminoEthanol
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF :	DiMéthylFormamide
DOPA :	3,4-dihydroxy-DL-phenylalanine
DRCI :	Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation
ECMO :	ExtraCorporeal Membrane Oxygenation
EDTA :	ÉthylèneDiamineTétraaAcétique
EGF :	Epithelial Growth Factor
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays
e-PTFE :	PolyTétraFluoroEthylène expansé
ESEM :	Environmental Scanning Electron Microscopy
EXIT :	Ex Utero Intra Partum Treatment
FETO :	FEtal Tracheal Occlusion
FIMATHO :	Filière Maladie Rare ThoracoAbdominale
FMR :	Fondation Maladie Rare

HDC :	Hernie Diaphragmatique Congénitale
ICPEES :	Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé
LHR :	Lung Head Ratio
LHR o/e :	Lung Head Ratio Observed/Expected
LPS :	LipoPolySaccharides
IGF :	Insulin-Like Growth Factor
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
MEB :	Microscope Electronique à Balayage (équivalent SEM)
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
MET :	Microscope Electronique à Transmission
MO :	Microscopie Optique
NSA :	Nonenyl Succinic anhydride
PDA :	PolyDopAmine
PD-ECGF :	Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PLUG :	Plug the Lung Until it Grows
PNMR :	Plan National Maladie Rare
PRF :	Platelet Rich Fibrin
PRP :	Platelet Rich Plasma
RIPH :	Recherche Impliquant la Personne Humaine

RPMI :	Roswell Park Memorial Institute Medium
SATT :	Société d'Accélération du Transfert de Technologies
SVF :	Serum de Veau Fœtal
TGF :	Transforming Growth Factor
THF :	TétraHydroFurane
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TPU :	Thermoplastiques PolyUrethanes
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor

## Liste des figures

Figure 1 : schéma de hernie diaphragmatique congénitale gauche tiré du site des Hôpitaux de Louvain : on peut y voir la migration des viscères dans le thorax et comprimant ainsi le médiastin et les poumons. Tiré du site des Hôpitaux de Louvain

Figure 2 : classification des hernies diaphragmatiques congénitales selon la taille du défaut, d'après The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group

Figure 3 : schéma représentant les coupes échographiques fœtales et aires de calcul du ratio LHR ; tiré du site des Hôpitaux de Louvain

Figure 4 : de Tim Van Mieghem, Louvain. Taux de survie des patients en fonction du LHR o/e et de la présence ou non de foie dans le thorax ; tiré d'une étude Jan Desprez

Figure 5 : illustration d'une fœtoscopie ; images du domaine public, tiré d'internet

Figure 6 : illustration d'une radiographie thoracique d'un nouveau-né porteur d'une hernie diaphragmatique congénitale gauche. On observe les viscères occupant l'hémichamp gauche (étoile bleue), la sonde gastrique s'enroulant dans l'estomac en position sus-diaphragmatique, la déviation médiastinale sur la droite (étoile rouge). Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Haute-pierre

Figure 7 : illustration d'une vue peropératoire de HDC gauche abordée par voie abdominale. Nous pouvons voir le poumon dysplasique (flèche) au travers du défaut ainsi que les berges diaphragmatiques (étoile). Source : service de chirurgie pédiatrique, CHU Haute-pierre

Figure 8 : illustration de séquelles cosmétique et fonctionnelles d'une chirurgie de HDC par lambeau musculaire. Source : service de chirurgie pédiatrique, CHU Haute-pierre

Figure 9 : illustration d'une fermeture directe par rapprochement des berges diaphragmatiques (en haut) et d'une fermeture par patch de Dualmesh® (en bas). Vue peropératoire, d'une

chirurgie de réparation de HDC gauche par abord abdominal. Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Haute-pierre

Figure 10 : a) Photographie d'un enfant d'âge scolaire, opéré en période néonatale d'une HDC gauche. Asymétrie de l'hémithorax gauche et attitude scoliotique à distance d'une chirurgie de HDC gauche ; b) Reconstruction scanographique 3D montrant la scoliose chez le même patient. Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Haute-pierre

Figure 11 : illustration d'une prothèse de Goretex Dualmesh® 2mm

Figure 12 : illustration d'une prothèse composite associant PTFE et Polypropylène (A) Gore-Tex/Marlex. (B) vue peropératoire d'une HDC. (C) fixation "sandwich de la prothèse composite.

Tiré de Kamran A and al

Figure 13 : deux exemples de mesure d'angle de contact sur e-PTFE en air ambiant

Figure 14 : micrographie en MEB de e-PTFE : a) en tranche x 250 ; b) face lisse x 250 ; c) : face lisse x 10 000

Figure 15 : Photographie de e-PTFE, face rugueuse ; micrographie en MEB de e-PTFE, face rugueuse x 100

Figure 16 : micrographie en MEB : Bande lisse (à gauche) et rugueuse (droite) de la face rugueuse du e-PTFE ; x 250

Figure 17 : micrographie en MEB : Bande lisse (à gauche) et rugueuse (droite) de la face rugueuse du e-PTFE ; x 5000

Figure 18 : en haut, méthode de fixation d'une éprouvette pour l'essai de traction uni-axiale (étoiles : points de colle). En bas, photo d'une éprouvette avant traction

Figure 19 : préparation des éprouvettes de e-PTFE en fonction de l'orientation des bandes sur la face rugueuse (flèche : axe parallèle aux bandes rugueuses) : groupe 01 : perpendiculaire à l'axe ( $90^\circ$ ) ; groupe 02 : parallèle à l'axe ( $0^\circ$ )

Figure 20 : machine de traction MTS, équipée d'une cellule de force de 100 N

Figure 21 : exemple de courbe de contrainte  $\sigma$  / déformation  $\varepsilon$  ingénierie et calcul du module de Young ( $\sigma/\varepsilon$ ) d'un tissu biologique, d'après Korhonen and al

Figure 22 : courbes de contrainte/déformation ingénierie du e-PTFE en fonction de l'orientation des bandes à la surface de sa face rugueuse (groupe 01 : bleu ; groupe 02 : vert)

Figure 23 : micrographie en MEB : Face lisse du e-PTFE après traction uni-axiale (flèche : axe d'étirement)

Figure 24 : micrographie en MEB : Bande lisse de la face rugueuse du e-PTFE soumis à un étirement uni-axial. L'agrandissement de la figure de droite montre l'alignement des fibres de e-PTFE

Figure 25 : micrographie en MEB : Bande rugueuse de la face rugueuse du e-PTFE après traction uni-axiale. La figure de droite (haut) montre un agrandissement de la zone centrale de la bande rugueuse et la figure de droite (bas) montre un agrandissement de la zone de transition entre bande rugueuse et bande lisse où l'alignement des fibres est plus important

Figure 26 : platine d'étirement placée au MEB

Figure 27 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; sans étirement (image de gauche ; x 1000) et étirement à 10 % (image de droite ; x 500)

Figure 28 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse avec un étirement à 30 % (x 500 image de gauche ; x 2000 image de droite)

Figure 29 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; étirement à 50 % à gauche et 75 % à droite ; x 500

Figure 30 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; étirement à 100 % ; x 1000

Figure 31 : explant n°2, vue de la face rugueuse. A : centre de la prothèse ; B : périphérie de la prothèse sans lâchage ; C : périphérie de la prothèse avec lâchage. 1 et 2: analyses MEB; 3: analyses MET; 4: analyses AFM. D'après A. Schneider

Figure 32 : microscopie optique. Coupe transversale de l'explant marqué au bleu de toluidine ; x 10. On constate l'abondance du tissu de recouvrement sur la face rugueuse (1) par rapport à la face lisse (2)

Figure 33 : microscopie optique (bleu de toluidine). Interface entre le tissu hôte recouvrant la prothèse et la face rugueuse de la prothèse ; x 20 en haut et x 40 en bas (étoile désignant la prothèse)

Figure 34 : microscopie optique (bleu de toluidine). Interface entre le tissu hôte recouvrant la prothèse et la face lisse de la prothèse ; x10 en haut et x40 en bas. Le tissu hôte semble pouvoir se « détacher » facilement et est comme posé à la surface de la prothèse avec une interface parfaitement identifiable (flèche) entre prothèse (étoile noire) et tissu hôte (étoile rouge)

Figure 35 : principe de la dessiccation par contournement du point critique

Figure 36 : micrographie en MEB. Recouvrement tissulaire de la prothèse au même grossissement (x 500). En haut : zone de lâchage face lisse (prothèse largement découverte). En bas : zone de lâchage face rugueuse (prothèse quasiment complètement recouverte)

Figure 37 : micrographie en MEB. Décollement du tissu hôte de la face lisse de la prothèse à proximité d'un orifice de passage de point de suture ; x 2000

Figure 38 : micrographie en MEB. Rupture du tissu conjonctif néoformé à la surface de la face lisse ; x 8000

Figure 39 : micrographie en MEB. Présence de tissu de colonisation sur les sites de passage des sutures (étoile)

Figure 40 : micrographie en MEB. Le tissu néoformé (flèche rouge) à la surface de la prothèse semble « ponter » les plis que forme celle-ci (flèche jaune)

Figure 41 : micrographie en MEB. Tapis de matrice extra cellulaire formée à la surface de la prothèse et visualisation d'épais faisceaux de fibres collagènes entremêlées ; x 500

Figure 42 : micrographie en MEB. Faisceaux de fibres collagènes à la surface de la prothèse, semblant s'orienter parallèlement aux forces de traction exercées par les points de fixation (axe de la double flèche). X 1000

Figure 43 : micrographie en MEB. Visualisation de couches successives de matrice extracellulaire recouvrant la prothèse (x 1000 en haut et x 4000 en bas)

Figure 44 : micrographie en MEB. Aspect fin de la matrice extracellulaire formée dans la zone de lâchage avec aspect d'évitement des nœuds (étoile) du e-PTFE

Figure 45 : micrographie en MET de l'explant en coupe transversale. Les images a) et b) correspondent à la zone sans lâchage ; les images c) et d) à la zone centrale de la prothèse ; et les images e) et f) à la zone de lâchage

Figure 46 : méthode de modélisation de la dynamique diaphragmatique ; tiré de Modelisation biomecanique du diaphragme humain : du CT-4D au modèle du mouvement, Saade et al

Figure 47 : illustration de l'imprégnation des membranes de e-PTFE en solution

Figure 48 : formation d'agrégats et de films de PDA à la surface du e-PTFE immergé dans une solution de dopamine (pH 8,5) sous agitation mécanique continue. D'après thèse A. Schneider

Figure 49 : aspect du Goretex® imprégné en fin d'immersion

Figure 50 : formation d'un film de PDA à l'interface air/eau et son transfert à la surface d'un substrat (e-PTFE par exemple) par la technique de Langmuir-Schaeffer

Figure 51 : angles de contact statiques mesurés pour le e-PTFE vierge, le e-PTFE\_i et e-PTFE\_f

Figure 52 : micrographie en MEB. Aspect des surfaces de e-PTFE (en haut), e-PTFE\_i (milieu) et e-PTFE\_f (en bas) en MEB. Les fissures dans le film de PDA transféré laissent entrevoir la structure poreuse du e-PTFE sous-jacent. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA

Figure 53 : micrographie en MEB. À plus fort grossissement, on vérifie l'aspect granulaire du film de PDA déposé sur le e-PTFE\_f

Figure 54 : images topographiques obtenues par AFM de la surface du e-PTFE\_i et e-PTFE\_f

Figure 55 : micrographie en MEB montrant les hétérogénéités de la surface du e-PTFE : étoiles jaunes = nœuds interfibrillaires, étoiles bleues = espaces « vides »

Figure 56 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du e-PTFE vierge (n = 20)

Figure 57 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du e-PTFE\_i (n = 14)

Figure 58 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du e-PTFE\_f (n = 33)

Figure 59 : activité mitochondriale exprimée en ratio d'une activité témoin en fonction des conditions testées. Le e-PTFE ou le e-PTFE modifié avec PDA ne semblent pas affecter l'activité mitochondriale et, par extension, la viabilité des cellules. Les cellules RAW 264.7 ont été incubées avec du e-PTFE ou du e-PTFE modifié par du DPA pendant 24 h avant que l'activité mitochondriale ait été évaluée à l'aide d'un test MTS. NT : non traité (ie: cellules seules). Tip : cônes de maintien des membranes au fond des puits. Activité exprimée en ratio d'une activité témoin (cellules seules)

Figure 60 : analyses en microscopie optique de cellules vivantes sur e-PTFE (en haut), e-PTFE\_f (milieu) et e-PTFE\_i (en bas), respectivement ; Leica ; x 40. La forme des cellules RAW 264.7 change radicalement en présence de PDA

Figure 61 : mêmes analyses microscopiques. Les cellules au contact du e-PTFE ne subissent aucune modification morphologique par rapport aux cellules contrôle (e-PTFE vs untreated cells). Par contre, en présence de PDA, on observe une modification de la morphologie même si elle reste moins marquée que notre contrôle positif, le LPS

Figure 62 : taux de Nitrite mesuré dans les surnageants en fonction des conditions (n = 3). Nous observons une grande variabilité des taux de la condition e-PTFE\_i (Légende : 0, puit témoin)

Figure 63 : taux de Nitrite mesuré dans les surnageants en fonction des conditions (n = 3). Nous n'observons plus de différence entre le e-PTFE natif et celui imprégné de PDA (Légende : Goretex vaut pour e-PTFE natif et dopa pour e-PTFE\_i)

Figure 64 : dosage de la production de TNF- $\alpha$  selon les conditions de e-PTFE. Les cellules RAW 264.7 cultivées avec du e-PTFE fonctionnalisé par PDA semblent subir une activation, comme le montre la production de TNF- $\alpha$ . NT : cellules seules. Tip : cônes de maintien des membranes au fond des puits

Figure 65 : illustration de la répartition des particules de PDA à la surface du e-PTFE

Figure 66 : micrographie en MEB (mode ESEM) d'une cellule souche de la gelée de Wharton WJ-SC à la surface de e-PTFE (en haut) versus e-PTFE\_i (en bas)

Figure 67 : micrographie en MET montrant la croissance de fibroblastes primaires à la surface de e-PTFE\_f. De nombreux contacts focaux des cellules en culture sont évidents à la surface du revêtement PDA nanométrique (flèches)

Figure 68 : micrographie en MEB (mode ESEM) montrant une cellule souche de Wharton dispersée sur e-PTFE\_f. On peut noter que les projections cytoplasmiques (flèche) sont orientées vers la zone revêtue de PDA (étoile)

Figure 69 : les constituants du sang sont décantés selon leur masse et leur taille. Les plus gros et lourds se déposent au fond du tube (hématies) tandis que les éléments plus légers restent proches de l'axe de rotation (fibrinogène, fibronectine...). Selon Dohan and al

Figure 70 : illustrations d'une membrane obtenue après centrifugation puis séparée des éléments surnageants et du culot erythrocytaire. Schématiquement, cette membrane est constituée d'un thrombus rouge à la jonction du culot erythrocytaire, d'un caillot de fibrine et d'une zone transitionnelle appelée le buffy coat (à droite, d'après Dohan et al (85))

Figure 71 : micrographie en MEB d'une membrane de PRF humain : on y voit un réseau de fibrine avec de nombreux éléments cellulaires et molécules plasmatiques

Figure 72 : modélisation en image de synthèse d'une molécule de fibrinogène. Selon Dohan et al (D-TEP© v1.3)

Figure 73 : illustration de l'obtention d'une membrane de PRF humain

Figure 74 : micrographie en MEB. Variabilité de l'aspect du noyau de fibrine selon le degré de compression de la membrane : compression excessive (en haut), protocole habituel (milieu) et PRF liquide (en bas)

Figure 75 : photographie et micrographie en MEB de la zone de jonction avec le culot erythrocytaire, riche en polyhédrocytes trappés dans le noyau de fibrine

Figure 76 : micrographie en MEB d'une tranche de PRF à hauteur du Buffy coat ; x 500. On constate la densité d'éléments cellulaires « piégés » au sein du réseau de fibrine

Figure 77 : micrographie en MEB. Nous savons que les plaquettes sont des cellules anucléées de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, discoïdes lorsqu'elles sont inactives (flèche, image du dessus) et s'étirant et émettant des prolongements lorsqu'elles sont activées (flèche, image du dessous) puis s'agréant. Parallèlement, la matrice de fibrine semble polymériser simultanément à cette activation plaquettaire (aspect granuleux de la matrice sur l'image du dessous comparativement à l'image du dessus)

Figure 78 : observations en MEB et MET de l'interaction entre PRF et PDA à la surface du e-PTFE après 8 heures de dépôt : de rares éléments de PRF semblent retenus à la surface du e-PTFE natif (A et D) alors que ces éléments semblent plus denses et plus intimement fixés en présence de PDA (B, C et E, F)

Figure 79 : micrographie en MEB. On observe une rétention de la matrice du PRF liquide à la surface des bandes rugueuses de la face rugueuse du e-PTFE

Figure 80 : micrographie en MEB. Culture de cellules HGF sur e-PTFE sans PRF en haut et avec PRF en bas. On constate des cellules ayant tendance à s'allonger en haut alors qu'en présence de PRF les cellules sont en état apoptotique, rondes, en amas, sans aucune migration

Figure 81 : représentation schématique du TPU composé de diisocyanate, de chaînes longues diol et d'alternance de chaînes dures et souples. Tiré du mémoire Master 2 R Migneret

Figure 82 : schéma explicatif de l'électrofilage d'après : Lavielle, N. Fabrication de nanofibres et nanoparticules de polyesters pour la libération contrôlée d'un composé modèle, thèse de l'université de Strasbourg. 161 (2013)

Figure 83 : illustration des appareils d'électrofilage utilisés pour nos travaux à gauche et d'un dépôt de membrane à droite

Figure 84 : micrographie en MEB. Aspect de la trame de fibrine d'une membrane PRF à gauche ; membrane de TPU électrofilé à droite

Figure 85 : schéma représentant l'aspect des fibres obtenues selon le produit entre viscosité et concentration de la solution ; d'après Lavielle et al

Figure 86 : photographie de granules de TPU à l'état brut

Figure 87 : micrographie en MEB. Influence de la concentration de la solution sur l'aspect des fibres obtenues, d'après R Migneret

Figure 88 : micrographie en MEB. Influence de la distance entre le support de membrane et l'aiguille

Figure 89 : micrographie en MEB. Influence du débit de distribution du nanofilament

Figure 90 : schémas illustrant la réalisation du film plein par évaporation

Figure 91 : photographie d'un films obtenus par évaporation

Figure 92 : exemple de délamination entre membrane et film

Figure 93 : micrographie en MEB d'une membrane biface obtenue en faisant varier les paramètres d'électrofilage en court de synthèse. De Gauche à droite : face lisse, face texturée, coupe transversale

Figure 94 : illustration d'une mesure d'angle de contact sur TPU

Figure 95 : courbes de contrainte/déformation ingénieur obtenues sur différentes membranes TPU

Figure 96 : micrographie en MEB (low vacuum x 1000) sur les membranes avec nanofilaments de petit calibre (L110) ; étirement exprimé en de la longueur initiale (+ 0 %, + 30 %, + 75 %, + 100 % de gauche à droite)

Figure 97 : illustration de la déformation des nanofilaments sous l'effet d'une traction uniaxiale à droite et aspect correspondant en observation MEB. Parallélisme des nanofilaments selon l'axe de traction (flèches rouges) et effet de flambement perpendiculaire (double flèche jaune)

Figure 98 : micrographie en MEB. Etirement des membranes de TPU en pourcentage de la longueur initiale. L110e : membrane à nanofilaments fins ; versant texturé, L116e : membrane à nanofilaments larges ; versant texturé, L116l : membrane à nanofilaments larges ; versant lisse

Figure 99 : illustration de l'analyse des membranes au repos, après un étirement de 100 % : photographie de la membrane sur l'appareil à traction et micrographie en MEB, x 1000

Figure 100 : photographie montrant l'aspect des membranes au repos, après un étirement de 400 %

Figure 101 : micrographie en MEB. Coupe transversale de la membrane L116 sous 300 % d'étirement, face lisse en surface (étoile). Les zones où l'électrofilage est visible augmentent leur surface sous la contrainte d'étirement (rond rouge)

Figure 102 : analyse de l'activité mitochondriale en MTS (n = 2). Il n'y a pas de différence significative entre les puits contenant des cellules seules, la colle de maintien des membranes et le TPU. Cells : cellules seules ; colle : colle de maintien ; smooth PU : face lisse de nos membranes ; textured PU : face texturée de nos membranes

Figure 103 : analyse morphologique au microscope optique Leica x 40 des cellules RAW 264.7 en fonction de leurs conditions A : cellules seules ; B : en présence de LPS (contrôle positif) ; C : en présence de e-PTFE PDA ; D : en présence de TPU

Figure 104 : dosage de nitrite dans le surnageant des cultures sur RAW 264.7. Nous ne notons aucune différence significative entre les différentes conditions testées. Cells : cellules seules ; colle : colle de maintien ; smooth TPU : face lisse de nos membranes ; textured PU : face texturée de nos membranes

Figure 105 : aspect des cellules C2C12 en microscopie optique : à gauche, myoblastes avant différenciation ; à droite, aspect des myotubes après différenciation. (Leica x 40)

Figure 106 : micrographies en MEB. Cultures in vitro de macrophages murins (étoiles ; A et B) et de cellules musculaires murines (étoiles ; C à F). On remarque des cellules parfaitement étalées sur le support, dont les prolongements (flèches) suivent les nanofilaments et s'enchevêtrent avec. Ces prolongements facilitent l'interconnexion des cellules

Figure 107 : micrographies en MEB. Nous constatons une colonisation diffuse, harmonieuse et orientée dès le 4ème jour de culture sur le TPU (A, B). Si l'on compare les observations entre TPU et e-PTFE, on constate une bien meilleure colonisation sur le TPU avec une

colonisation anarchique et irrégulière sur le e-PTFE et surtout, l'impression d'une rupture de colonisation en lien avec les bandes rugueuses de la face rugueuse (C et D). les bandes rugueuses semblent faire barrière à une colonisation de proche en proche du matériau avec des prolongements cellulaires qui d'interrompent à la lisière de celles-ci puis une surface trop chaotique pour que les cellules y trouvent un point d'attache (D)

Figure 108 : micrographies en MEB. Les cellules semblent peu adhérentes au support e-PTFE

Figure 109 : micrographies en MEB. Les cellules vont certes « s'étaler » sur le support en e-PTFE mais semblent faiblement adhérentes, ont moins d'interconnexion entre elles, et ne semblent coloniser que les bandes lisses de la face rugueuse

Figure 110 : micrographies en MEB. Aspect des cellules RAW 264.7 (étoiles) sur la face lisse du TPU ; les cellules sont moins étalées, sans réelles interconnexions entre elles

Figure 111 : micrographies en MEB. Les fibroblastes humains (étoile) s'étalent parfaitement à la surface du TPU

Figure 112 : monographie en MEB. Les cellules forment un tapis qui tend à s'uniformiser de proche en proche

Figure 113 : micrographie en MEB. Images A à D : aspect des fibroblastes BJ sur le e-PTFE fonctionnalisé par la PDA. Images E et F : fibroblastes à la surface du e-PTFE natif

## Liste des tableaux

Tableau I : résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du e-PTFE (groupe 01 : 90° ; groupe 02 : 0°)

Tableau II : mesures des modules de Young du e-PTFE natif et de l'explant

Tableau III : paramètres de synthèse des membranes de TPU testées

Tableau IV : modules de Young obtenus sur le TPU et comparé au e-PTFE

## Liste des annexes : publications

Schneider A, Talon I Mathieu E, Schaaf P, Becmeur F, Hemmerlé J. New insight in the biological integration of polytetrafluoroethylene from an explant used for diaphragm repair. J Biomater Appl. 2017 ; 31(6) : 844–850

Talon I, Schneider A, Mathieu E, Senger B, Frisch B, Seguin C, Ball V, Hemmerlé J. How polydopamine modulates biological responses to PTFE prostheses. Mat Sci Appl. 2019 ; 10(05) : 377-392

Talon I, Schneider A, Ball V, Hemmerle J. Polydopamine functionalization: a smart and efficient way to improve host responses to e-PTFE implants. Frontiers. 2019.*En revision*

Talon I, Schneider A, Ball V, Hemmerle J. An original way of biological functionalisation of modified PTFE biomaterial. J Pediatr Res.2019. *En soumission*

## INTRODUCTION GENERALE

La chirurgie pédiatrique a pour spécificité de s'intéresser particulièrement aux maladies rares de l'enfant. Ces maladies dites rares sont le plus souvent des maladies graves et parfois invalidantes, et pour cela, elles ont été retenues comme l'une des cinq grandes priorités de la loi relative à la politique de santé publique du 9 août 2004. Afin de structurer et d'optimiser leur prise en charge, le ministère de la santé a mis en place dès 2005 un plan national incluant la création de centres de référence et de centres de compétence encadrant ainsi les soins et la recherche relatifs à chacune d'entre elle. Les deux premiers plans (2005-2008 puis 2011-2014) ont contribué à des avancées majeures qu'il était nécessaire de conforter par la création depuis 2018 du 3<sup>e</sup> plan PNMR (2018-2022).

La hernie diaphragmatique congénitale fait partie de ces maladies rares, d'une part du fait de sa faible prévalence (1/2500 à 1/4000 naissances vivantes), mais aussi de sa potentielle gravité puisqu'on évalue le taux de mortalité après naissance entre 30 et 40% malgré les nombreux progrès en termes de diagnostic comme de prise en charge. De nombreux axes de recherches se structurent ainsi autour de cette pathologie aussi bien pour comprendre son étiopathogénie que pour améliorer sa prise en charge prénatale et postnatale.

Dans ce contexte, un registre a été créé en 2007 incluant de manière prospective tous les nouveaux cas diagnostiqués et pris en charge dans les 34 CHU nationaux afin d'organiser leur prise en charge et d'améliorer les pratiques et le suivi à court, moyen et long terme de ces patients.

En tant que centre de compétence investi de longue date dans la prise en charge de cette pathologie, l'équipe médicale du service de chirurgie pédiatrique des Hôpitaux Universitaires

de Strasbourg développe depuis de nombreuses années des travaux cherchant à améliorer la prise en charge chirurgicale postnatale des nouveau-nés présentant une telle pathologie.

Nous allons ainsi définir le cadre dans lequel s'inscrivent ces travaux de thèse.

- 1) Définir le cahier des charges d'une prothèse diaphragmatique optimale. Le but ultime est de produire une nouvelle membrane qui répondra aux critères définis. Cet élément fait l'objet d'une démarche auprès de la SATT Connectus en partenariat avec la Fondation Maladie Rare.
- 2) Dans l'intervalle de temps, indispensable pour le développement d'une telle innovation, nous avons entrepris des travaux de recherches ciblant la fonctionnalisation du produit le plus utilisé actuellement (Goretex<sup>®</sup>, Dualmesh). Cette voie de recherche a été conduite de manière séquentielle : dans un premier temps nous avons mis au point deux méthodes de fonctionnalisation chimique du Goretex<sup>®</sup> (réputé inerte donc très difficile à recouvrir), puis, dans un deuxième temps, nous avons étudié la possibilité de potentialiser biologiquement ce premier revêtement.
- 3) Finalement, nous avons mené des investigations sur une prothèse innovante, en ce sens qu'elle serait étirable et présenterait une structure biface.

## 1) CONTEXTE DANS LEQUEL S'INSCRIT LA RECHERCHE

### a) La Hernie Diaphragmatique Congénitale (HDC)

#### i) Rappels et Définition

Le diaphragme est le muscle respiratoire principal, alors que les muscles intercostaux constituent les muscles respiratoires secondaires. C'est une cloison musculo-aponévrotique séparant physiquement la cavité thoracique de la cavité abdominale. Il est constitué :

- D'un noyau central tendineux, traversé principalement par l'œsophage, l'aorte et la veine cave supérieure,
- Et deux chefs musculaires périphériques (muscle digastrique) formant une voûte convexe de muscle strié.

Le diaphragme naît de la fusion de trois structures embryonnaires, entre la 4<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse : les membranes pleuropéritonéales, le septum transversum et le méso-œsophage. La migration et la fusion de ces diverses structures est finement régulée (1) ainsi que les phénomènes de muscularisation de la membrane ainsi formée avec plus de 50 gènes décrits comme impliqués dans ces mécanismes d'embryogénèse.

La hernie diaphragmatique congénitale (HDC) se définit par la présence d'un défaut postérolatéral du muscle diaphragmatique, laissant ainsi communiquer thorax et abdomen avec passage des viscères abdominales dans le thorax (figure 1). Ce défaut se situe à gauche dans plus de 80 % des cas, à droite dans un peu plus de 10 % des cas et bilatéral dans 2 % des cas. Il apparaît très précocement, lors de l'embryogénèse, avant la 10<sup>e</sup> semaine de grossesse. Son mécanisme reste encore inconnu et de nombreuses hypothèses sont cités (2) : herniation d'une anse intestinale gênant la fermeture des canaux pleuropéritonéaux, induction par une anomalie plus précoce du développement pulmonaire, défaut d'innervation précoce du tissu diaphragmatique par le nerf phrénique (3), défaut de colonisation musculaire

du tissu primitif (4). Finalement l'hypothèse qui semble la plus probable est celle d'une survenue encore plus précoce de l'anomalie, lors de la formation des membranes pleuropéritonéale, avant même leur migration. En effet, l'analyse des modèles d'HDC par Nitrofène a permis la mise en évidence d'une augmentation de la mort cellulaires au niveau des somites cervicaux responsables de la formation des membranes (5, 6).

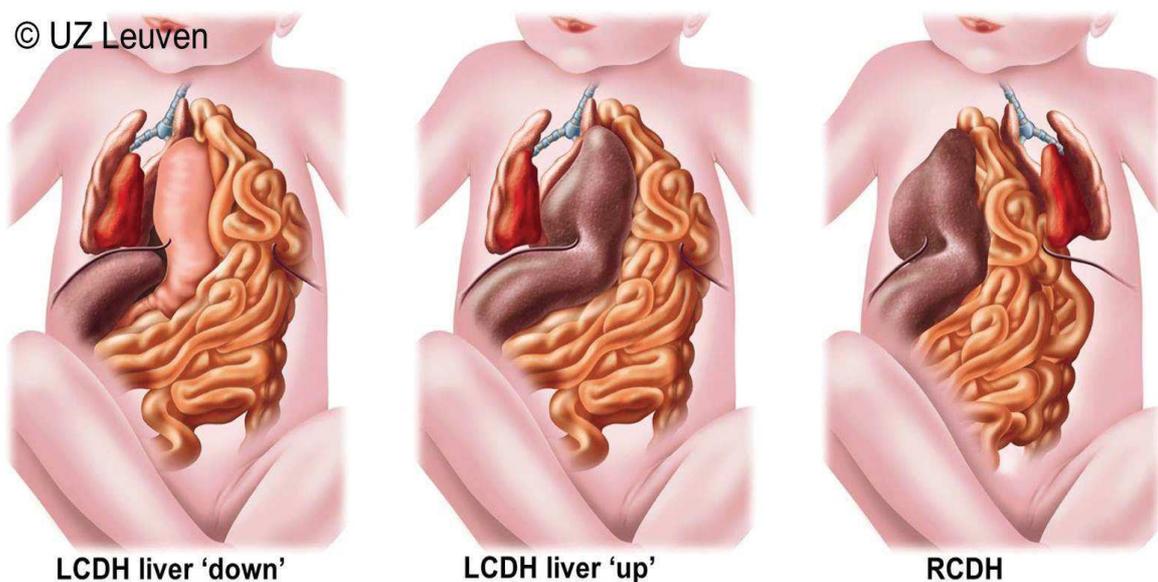


Figure 1 : schéma de hernie diaphragmatique congénitale gauche tiré du site des Hôpitaux de Louvain : on peut y voir la migration des viscères dans le thorax et comprimant ainsi le médiastin et les poumons. Tiré du site des Hôpitaux de Louvain

La HDC est systématiquement associée à une hypoplasie pulmonaire de deux origines :

- La perturbation de gènes et de facteurs de transcriptions intervenant dans la formation du parenchyme pulmonaire et sa maturation. Ces perturbations peuvent être en lien avec les perturbateurs environnementaux (7-9).
- Les facteurs mécaniques dûs à la présence des viscères abdominaux dans le thorax du côté atteint expliquant la prédominance de l'hypoplasie pulmonaire du côté atteint : baisse de l'activité inspiratoire in utero du diaphragme, augmentation de la fuite du

liquide pulmonaire par le larynx, distension moindre du tissu pulmonaire par baisse de l'espace d'expansion du poumon par les viscères.

Enfin, la vascularisation artérielle pulmonaire va elle aussi se développer anormalement avec une prolifération des cellules musculaires vasculaires et un épaissement de la média des artères (10). Une hypertension artérielle pulmonaire s'installe très tôt dans le développement embryonnaire et participe au pronostic de cette pathologie.

Différentes classifications existent. La plus ancienne tient compte de la taille du defect puisqu'il semble que ce soit le critère le plus représentatif de la sévérité de l'atteinte et donc de la survie. The congenital diaphragmatic hernia study group, créé en 1995 et regroupant plus de 50 centres de prise en charge à travers le monde, a défini une classification en 4 stades (figure 2) de A, défaut le plus petit, à D correspondant à une agénésie complète de coupole (11).

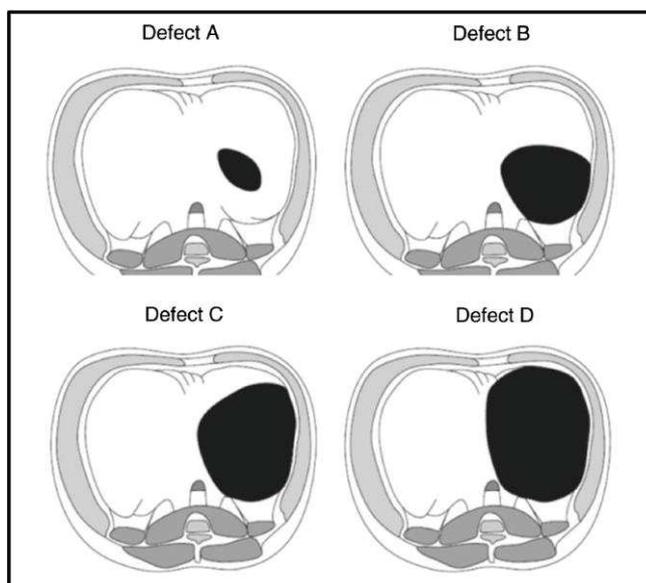


Figure 2 : classification des hernies diaphragmatiques congénitales selon la taille du défaut, d'après The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group

D'autres tiennent compte du délai de diagnostic, à savoir une révélation précoce ou tardive. Les HDC à révélation précoce sont le plus souvent de diagnostic anténatal sur les échographies fœtales de dépistage, et ont un pronostic sévère du fait de l'hypoplasie pulmonaire et de l'hypertension artérielle pulmonaire associées. Elles sont symptomatiques à la naissance.

Les HDC dites de révélation tardive (qui ne représentent que 3 % des HDC) ont un pronostic nettement plus favorable (100 % de survie) en raison de complications pulmonaires nettement moins marquées (12).

Actuellement, nous avons plutôt tendance à classer les HDC selon des critères prénataux prédictifs de la gravité. En effet, l'évaluation de la taille du défaut n'est pas réalisable lors de la découverte anténatale de ces hernies et ce n'est donc pas un critère que l'on peut utiliser lors du suivi des grossesses pour guider la prise en charge anténatale et postnatale.

Pendant longtemps, le critère le plus utilisé était donc le « Lung Head Ratio » (LHR). Il correspond au rapport entre la surface du poumon fœtal et le périmètre crânien calculé sur les clichés d'échographie fœtale (figure 3). La première description de ce rapport remonte à 1996 par Metkus (13).

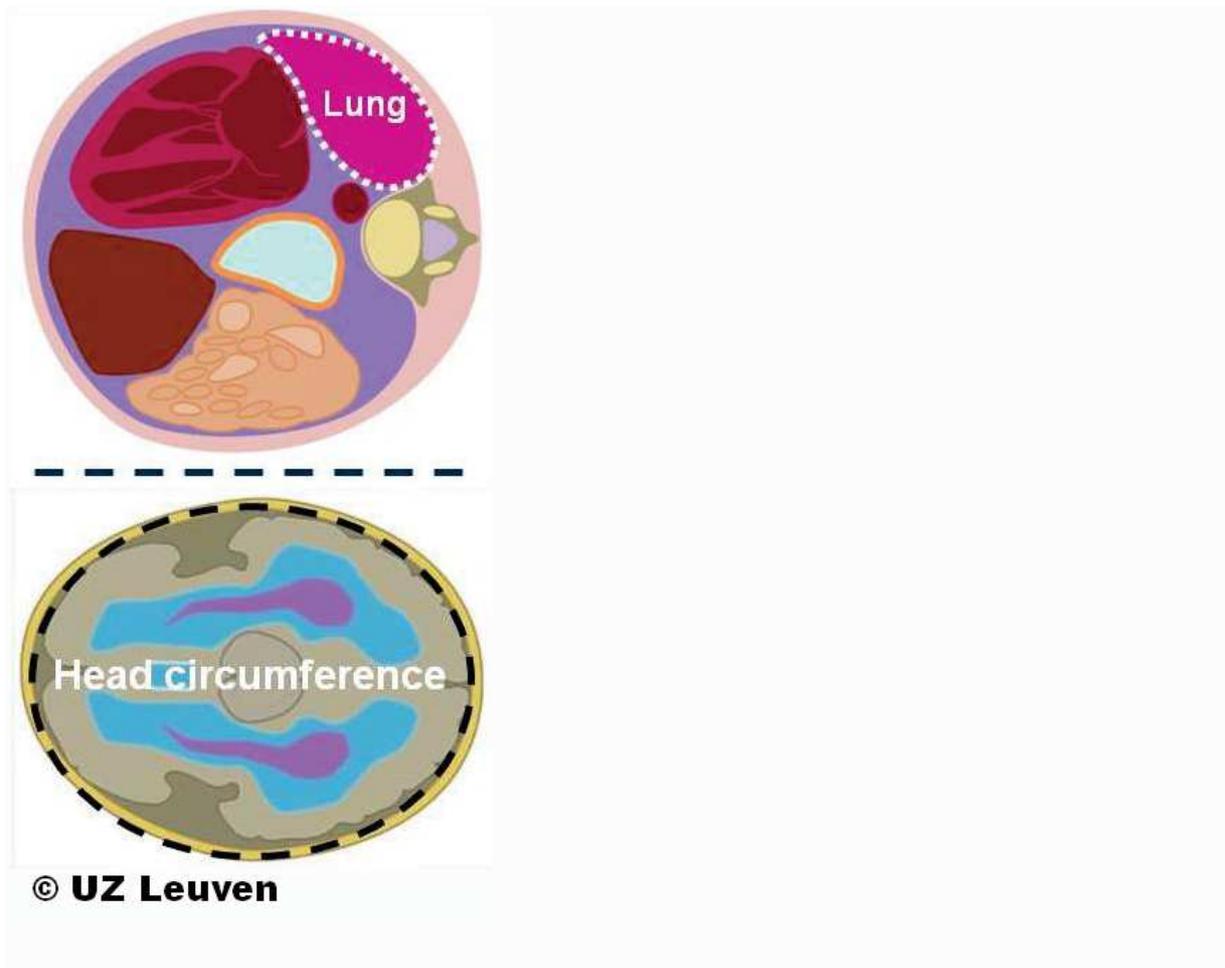


Figure 3 : schéma représentant les coupes échographiques fœtales et aires de calcul du ratio LHR ; tiré du site des Hôpitaux de Louvain

A ensuite été développé le LHR o/e, correspondant au LHR observé pour le LRH attendu pour l'âge gestationnel du fœtus. En effet, ce LHR va augmenter avec l'âge gestationnel chez tous les fœtus et donc sa valeur sera non seulement fonction de la présence d'une HDC mais aussi de l'âge gestationnel, créant ainsi un biais d'interprétation sur sa valeur prédictive (14). Si l'on rapporte le LHR mesuré à la valeur attendue à un stade défini de grossesse, on obtient alors le LHR o/e dont la valeur est de 100 % chez un fœtus sans HDC quel que soit l'âge gestationnel. Cette série a permis de mettre en évidence que le LHR o/e reste indépendant de l'âge gestationnel chez les enfants porteur d'une HDC gauche avec une moyenne de 39 %. Elle a également montré qu'une valeur inférieure à 25 % de ce LHR o/e était associée à un pronostic sombre.

La présence du foie dans le thorax fœtal est un critère analysable sur les échographies fœtales et semble être un autre facteur prédictif de la survie et de la morbidité respiratoire des bébés porteur de HDC. Une étude de 2017 portant sur 59 diagnostics anténataux de HDC retrouve un taux de survie globale de 73 %. La présence du foie dans le thorax était retrouvée chez 37 % des survivants contre 69 % des non survivants (15). Jan Desprest de l'université de Louvain, (16, 17) a publié une classification du pronostic vital tenant compte du LHR o/e et de la position hépatique (figure 4).

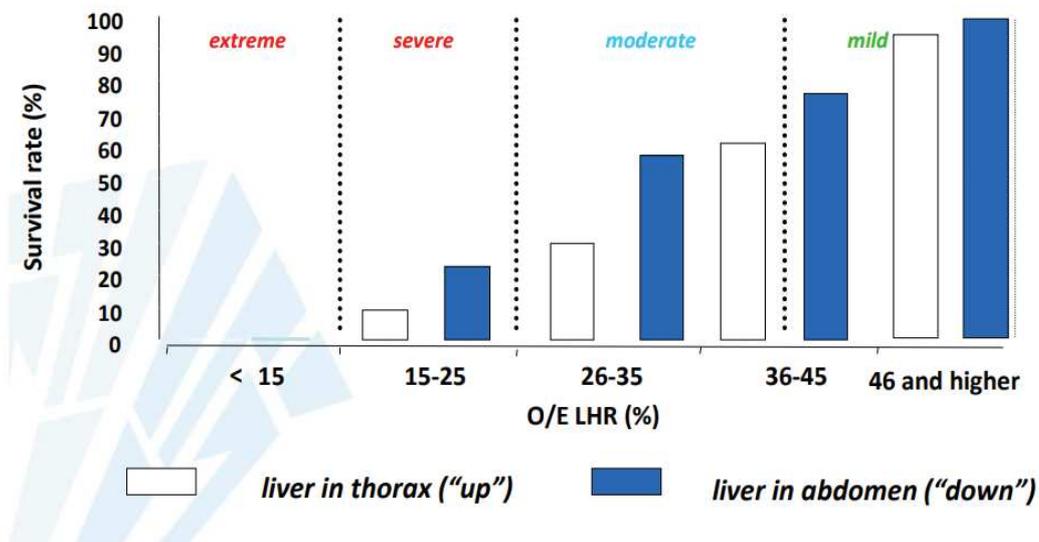


Figure 4 : de Tim Van Mieghem, louvin. Taux de survie des patients en fonction du LHR o/e et de la présence ou non de foie dans le thorax ; tiré d'une étude Jan Desprest (16)

Enfin il est également possible de mesurer le volume pulmonaire en IRM fœtale ou en échographie tridimensionnelle, facteur pronostic complémentaire qui aide à définir la gravité de la HDC et les alternatives de suivi et de prise en charge (18, 19).

## **ii) Prise en charge des HDC**

### **(1) Prise en charge anténatale**

Dès le diagnostic évoqué lors de la réalisation d'échographies fœtales, la maman du bébé à naître sera référée auprès d'un centre de diagnostic prénatal où l'obstétricien doit s'efforcer d'une part, d'évaluer les critères pronostiques sus-cités, d'autre part de rechercher d'éventuelles malformations associées, puisqu'elles aussi vont grever le pronostic vital de l'enfant à naître. Ces centres incluent un Comité Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN) permettant d'informer tous les professionnels (comme par exemple les chirurgiens pédiatres, les réanimateurs, les psychologues) amenés à prendre en charge le fœtus ou le nouveau-né, et permettant aux parents de rencontrer avant toute décision l'ensemble des professionnels intervenants dans la prise en charge de l'enfant à naître. Dans certaines situations, l'interruption médicale de grossesse est l'option choisie, typiquement en cas d'anomalies chromosomiques mises en évidence, ou de syndrome polymalformatif sévère.

En cas de poursuite de la grossesse et d'HDC isolée, la prise en charge dépendra principalement des critères pronostiques sus-cités.

Une chirurgie fœtale peut être proposée devant un LRH o/e < 25 % et la présence de foie dans le thorax fœtal chez un fœtus porteur d'une HDC gauche isolée. Dans ce cas, la technique FETO (FETal Tracheal Occulsion) est à l'heure actuelle la technique de référence, et fait l'objet d'un encadrement scientifique par le biais d'un consortium européen depuis 2009, permettant de garantir les cadres de cette pratique. Elle consiste en la mise en place d'un ballonnet gonflable (PLUG) dans la trachée fœtale par fœtoscopie à 28 semaines d'aménorrhée (figure 5), pour un retrait (DEPLUGGING ou UNPLUG) de celui-ci à 34 semaines d'aménorrhée soit lors d'une seconde fœtoscopie (46 %) soit par ponction échoguidée (24 %), soit par technique EXIT (9 %) soit en postnatal immédiat (21 %).



Figure 5 : illustration d'une fœtoscopie ; images du domaine public, tiré d'internet

Quelle que soit la technique d'exsufflation ou de retrait du ballonnet, celle-ci se fait dans un contexte d'urgence dans plus de la moitié des cas. Dans ce contexte, des équipes cherchent à développer des moyens d'obstruction trachéale ne nécessitant pas de geste de retrait ou de ponction, afin de diminuer la morbidité induite par cette séquence de geste, morbidité pour la mère comme pour le fœtus. L'équipe de Nicolas Sananes développe par exemple un ballon d'obstruction trachéal fœtal muni d'une vanne magnétique dont l'ouverture est actionnée par le champ magnétique d'une IRM (20).

L'obstruction trachéale va permettre une rétention du liquide produit par l'épithélium pulmonaire, liquide dont on sait le rôle primordial dans le développement pulmonaire (21). Ainsi, l'occlusion temporaire de la trachée va accélérer le processus de développement volumique et de maturation de ce poumon hypoplasique.

Quelle que soit la prise en charge anténatale, ces grossesses sont référées aux centres de référence disposant d'un plateau technique incluant au minimum une maternité de niveau III,

une réanimation néonatale, un service de chirurgie pédiatrique. Ces structures correspondent sur le territoire français aux Centres Hospitalo-Universitaires.

## (2) Prise en charge post natale

L'urgence est à la prise en charge de la détresse respiratoire induite d'une part par l'hypoplasie pulmonaire, d'autre part par le manque d'espace disponible dans le thorax pour l'expansion pulmonaire et la ventilation (figure 6). A cela s'ajoute rapidement une poussée d'hypertension artérielle pulmonaire. Ainsi, l'urgence n'est pas à la chirurgie de réparation mais à une réanimation intensive et adaptée afin de stabiliser les paramètres cardiorespiratoires et d'amener le nouveau-né à la chirurgie dans les meilleures conditions possibles (22, 23).

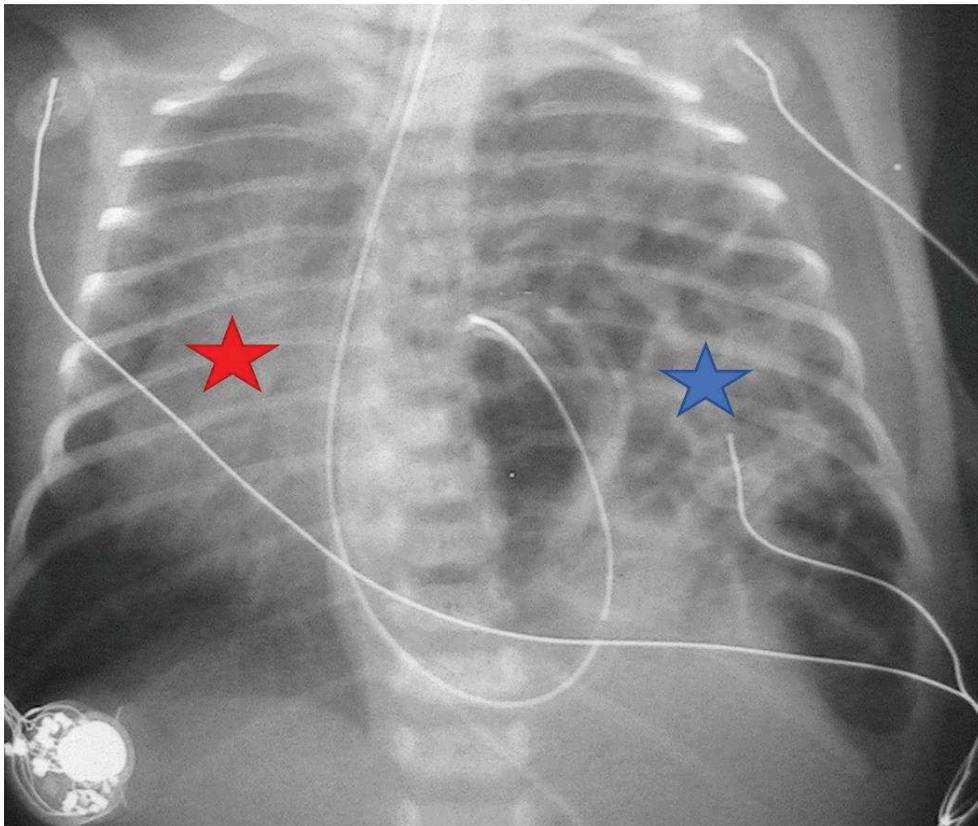


Figure 6 : illustration d'une radiographie thoracique d'un nouveau-né porteur d'une hernie diaphragmatique congénitale gauche. On observe les viscères occupant l'hémichamp gauche (étoile bleue), la sonde gastrique s'enroulant dans l'estomac en position sus-diaphragmatique, la déviation médiastinale sur la droite (étoile rouge). Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Haute-pierre

Le moment de la chirurgie sera ainsi décidé collégalement entre réanimateurs et chirurgiens, en fonction de l'histoire de la grossesse, des facteurs prédictifs anténataux, des moyens de réanimation rendus nécessaires et de leur efficacité, de la présence éventuelle de signes de souffrance des viscères herniés... Classiquement cette chirurgie a lieu au cours de la première semaine de vie. Elle repose sur deux grands principes : réduire le contenu hernié (réintégrer les viscères dans la cavité abdominale) et fermer le défaut diaphragmatique (figure 7).

Plusieurs voies d'abord et techniques sont possibles et le choix de l'une d'entre elles reposera sur l'expérience du chirurgien (certains développent des domaines d'expertise non maîtrisés de tous), sur l'état cardiorespiratoire du nouveau-né, la gravité suspectée de la HDC et l'existence ou non de comorbidités.

#### Voies d'abord :

La voie d'abord de référence est la laparotomie sous costale. Ses principaux avantages sont :

- Un accès aisé aux berges diaphragmatiques,
- L'absence de gêne ventilatoire induite par la chirurgie (aucune instrumentation endothoracique),
- Une réintégration aisée des viscères herniés,
- La possibilité de dépister les malformations digestives éventuellement associées et en réaliser la cure si besoin (classiquement les troubles de la rotation intestinale,
- Réaliser la cure de reflux gastro-oesophagien surtout en cas de HDC à large défaut.

Ses inconvénients résident principalement dans le risque secondaire d'occlusion sur bride (risque inhérent à toute laparotomie), le préjudice cosmétique, la nécessité d'une analgésie plus importante et prolongée en postopératoire.

Une alternative dite mini-invasive s'est développée au cours des années 2000 : la thoracoscopie. Les objectifs restent identiques. Ses principaux avantages sont :

- L'absence de délabrement pariétal,
- La réduction des besoins en sédation et en analgésie postopératoire,
- Une réalimentation plus précoce...

Cependant, cette voie d'abord pose le problème de la tolérance ventilatoire du fait de la nécessité de placer l'enfant en décubitus controlatéral (avec compression du poumon sain), d'insuffler un pneumothorax durant l'intervention. Par ailleurs, elle ne permet pas de contrôler les éventuelles anomalies digestives ni de réaliser une chirurgie antireflux.

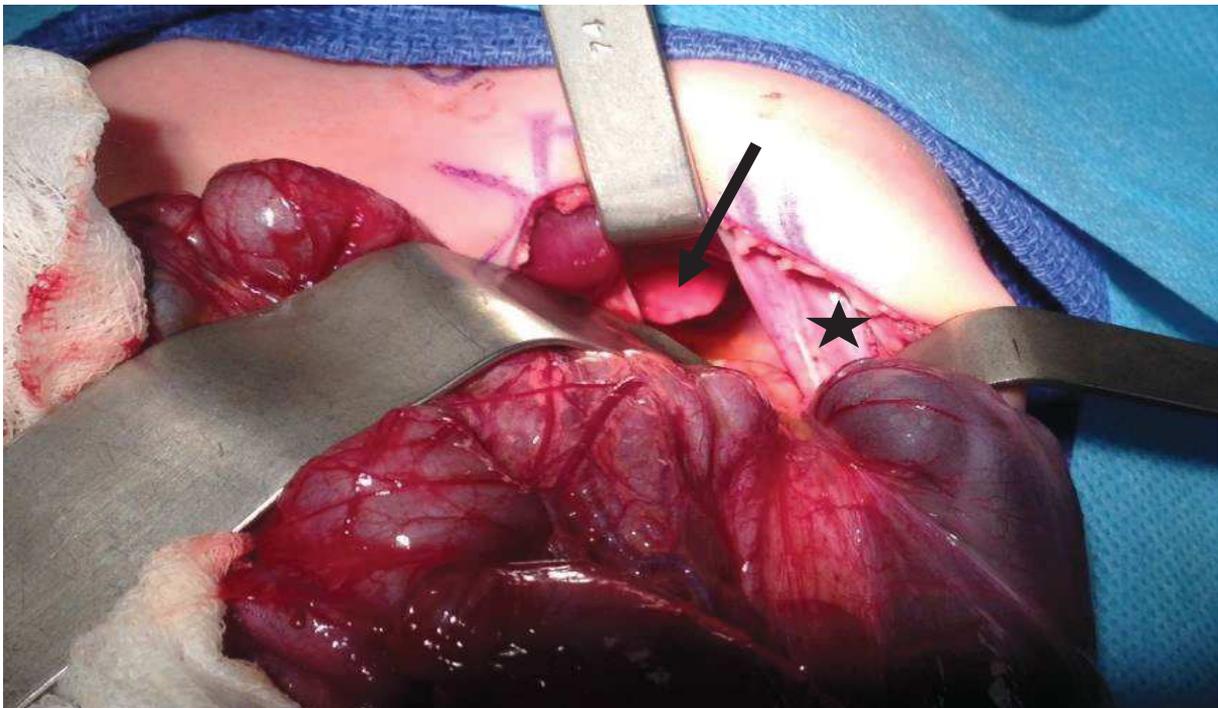


Figure 7 : illustration d'une vue peropératoire de HDC gauche abordée par voie abdominale. Nous pouvons voir le poumon dysplasique (flèche) au travers du defect ainsi que les berges diaphragmatiques (étoile). Source : service de chirurgie pédiatrique, CHU Hautepierre

### Techniques opératoires :

Il n'y a pas de technique à proprement parlé concernant la réduction des viscères herniés. Par contre, la fermeture du défaut diaphragmatique va être plus ou moins complexe en fonction essentiellement de la taille du défaut.

Dans les situations les plus simples, en cas de défaut de petite taille (stade A et B de la classification sus citée), une fermeture directe par affrontement des berges et suture sera privilégiée, quelle que soit la voie d'abord. Dès lors que cette fermeture directe n'est pas possible et/ou si elle se fait sous tension excessive, le chirurgien doit envisager un remplacement diaphragmatique ce qui correspond à 46 % des formes (24). Cela correspond le plus souvent aux stades C et D. Historiquement, ce remplacement se faisait par la réalisation de lambeau musculaire, le plus souvent lambeau de muscle grand dorsal, oblique interne ou encore transverse homolatéral (25). Ces lambeaux étant pédiculés, ils vont grandir avec l'enfant et réduire au maximum le taux de récurrence. Mais cela se fait au prix d'un délabrement pariétal majeur avec des séquelles orthopédiques, fonctionnelles et cosmétiques potentiellement majeures (figure 8). Ce sont des chirurgies lourdes avec un risque de complications immédiates à type d'hématomes, d'infections, de troubles de cicatrisation...



Figure 8 : illustration de séquelles cosmétique et fonctionnelles d'une chirurgie de HDC par lambeau musculaire. Source : service de chirurgie pédiatrique, CHU Hautepierre

Ces chirurgies ont donc été quasiment abandonnées au profit du développement de prothèses (figure 9), puisqu'aujourd'hui, 17 % seulement des chirurgiens vont opter pour un lambeau musculaire, 83 % pour un patch prothétique (26). Une étude monocentrique récente comparant la réparation par lambeau musculaire (n = 19) à l'utilisation d'un patch (n = 32) ne retrouve pas de différence en termes de morbi-mortalité à court et long terme (27).

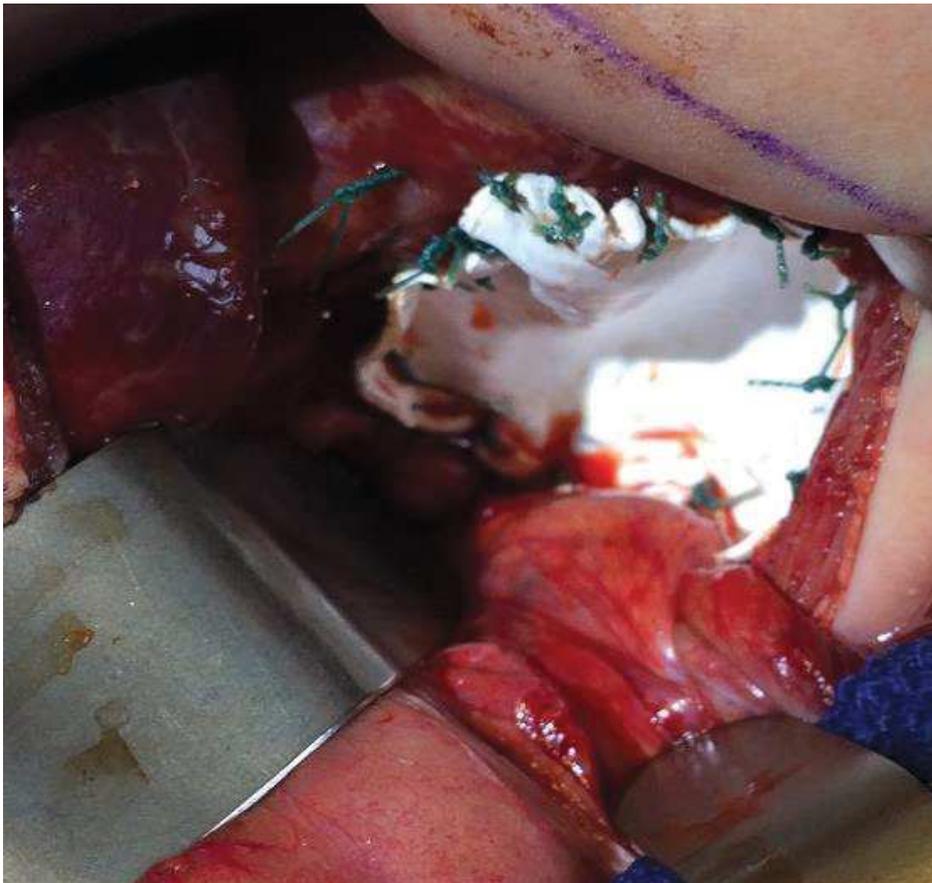
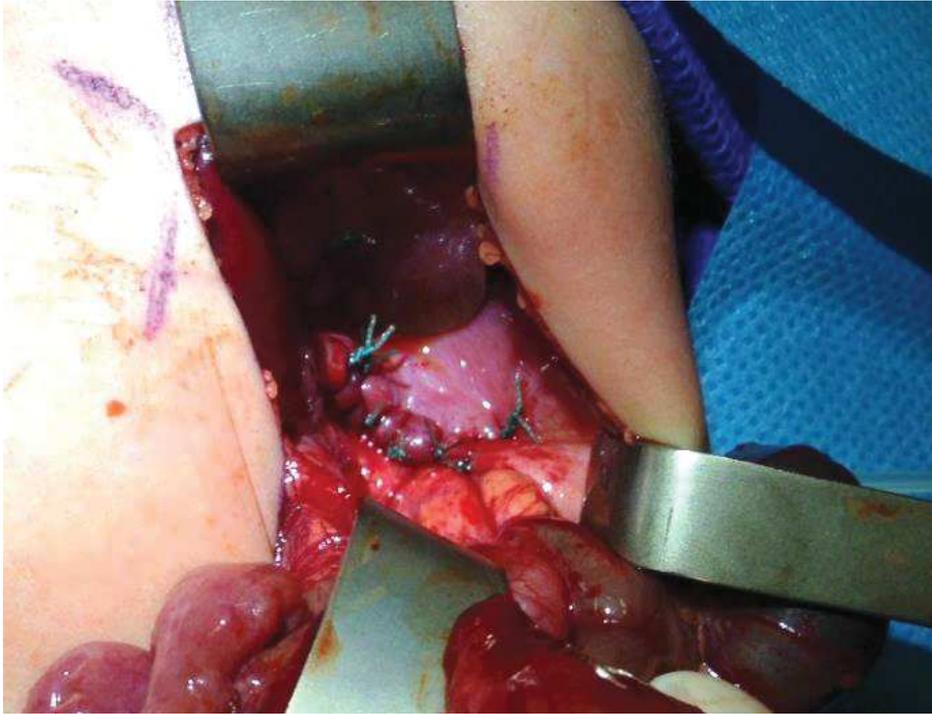


Figure 9 : illustration d'une fermeture directe par rapprochement des berges diaphragmatiques (en haut) et d'une fermeture par patch de Dualmesh® (en bas). Vue per opératoire, d'une chirurgie de réparation de HDC gauche par abord abdominal. Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Hautepierre

En postopératoire immédiat, l'un des objectifs est d'aboutir à une « déventilation » rapide, un sevrage des traitements de l'hypertension artérielle pulmonaire, de pouvoir réalimenter le nouveau-né le plus précocement possible, sur sonde initialement, accompagné d'une stimulation à l'oralité pour une autonomisation secondaire. Un reflux gastro-oesophagien est très souvent associé, surtout dans les formes à large défaut, motivant tantôt une chirurgie antireflux, tantôt un traitement médicamenteux de ce reflux.

A plus long terme, un suivi multidisciplinaire est essentiel afin de dépister les complications possibles, respiratoires, nutritionnelles, musculo-squelettiques (figure 10), gastro-intestinales, neuropsychologiques (28), complications présentes dans plus de la moitié des cas, et plus encore en cas de HDC avec patch, à large défaut, ou encore ayant nécessité des techniques cardioventilatoires invasives (exemple : ECMO).

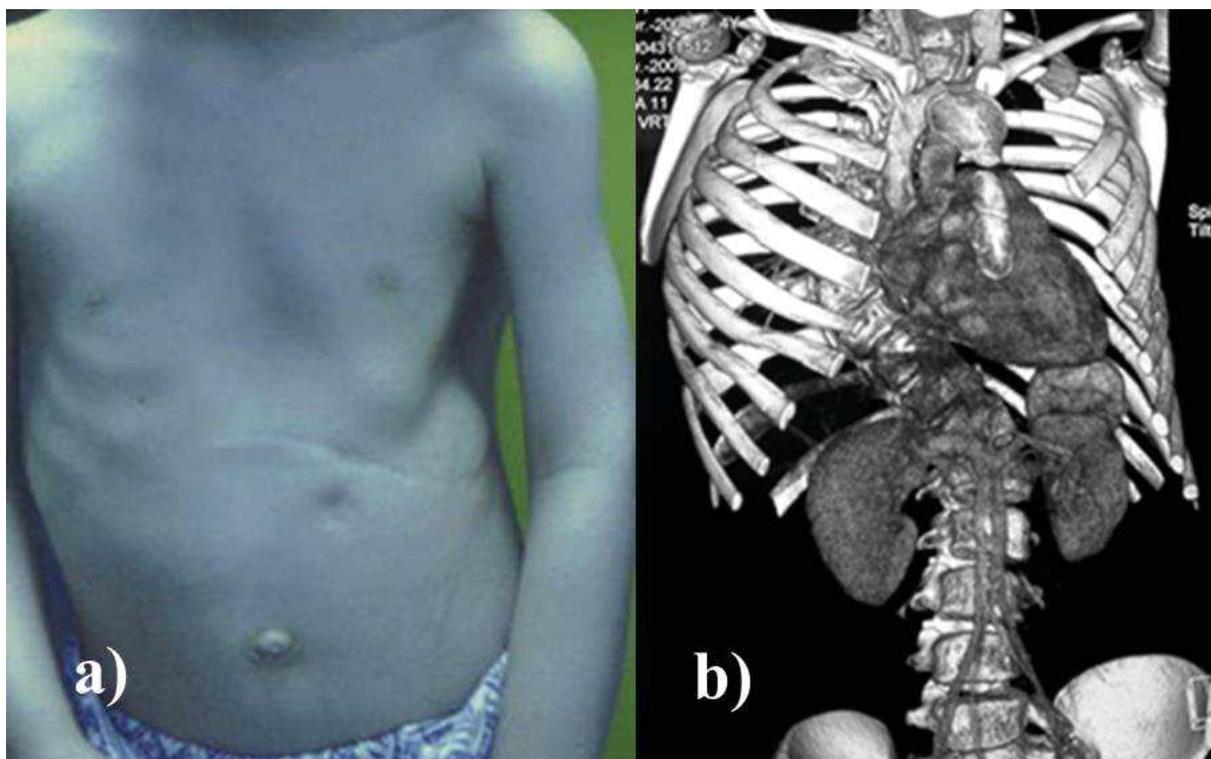


Figure 10 : a) Photographie d'un enfant d'âge scolaire, opéré en période néonatale d'une HDC gauche. Asymétrie de l'hémithorax gauche et attitude scoliotique à distance d'une chirurgie de HDC gauche ; b) Reconstruction scanographique 3D montrant la scoliose chez le même patient. Source : service de chirurgie pédiatrique CHU Hautepierre

La complication qui reste un défi pour le chirurgien est la récurrence herniaire. Les progrès de prise en charge anténatale, de réanimation néonatale, ont permis d'amener à la chirurgie des patients porteurs d'HDC sévères, augmentant ainsi la part de recours aux prothèses diaphragmatiques. Or le taux de récurrence herniaire est plus important en cas de prothèse, la présence d'une prothèse constituant un facteur indépendant de récurrence (29, 30). Pourquoi ?

Le matériau idéal n'existe pas. Actuellement, les matériaux utilisés vont tantôt être pourvoyeurs de troubles musculosquelettiques par les contraintes mécaniques qu'ils induisent, tantôt entraîner des réactions inflammatoires excessives par leur caractère résorbable. Dans tous les cas, ils peuvent s'accompagner de récurrence par détachement de la prothèse de ses attaches périphériques ou par résorption sans substitution par un tissu hôte. Plus de la moitié des récurrences auront lieu durant les premières années de vie (31) probablement en lien avec une phase de croissance importante de l'enfant, des pics de croissance rapide entraînant probablement des sollicitations importantes au niveau des prothèses et de la jonction tissu hôte-prothèse (32). A ceci s'ajoutent les sollicitations mécaniques ventilatoires et d'acquisition de la verticalisation.

Quoi qu'il en soit, la récurrence lorsqu'elle survient, peut être découverte soit fortuitement lors des examens de surveillance, soit sur une symptomatologie évocatrice : toux, occlusion, dyspnée voire véritable détresse respiratoire... Ces symptômes doivent motiver la réalisation d'examens paracliniques afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Lorsqu'elle est mise en évidence, la récurrence impose systématiquement une prise en charge chirurgicale dont les principes sont identiques à la chirurgie primaire à savoir une réduction du contenu hernié et une fermeture du défaut avec retrait de la prothèse initiale.

Nous discuterons dans le chapitre suivant des différents matériaux disponibles sur le marché. Quoi qu'il en soit, en dehors du choix du type de prothèse, divers artifices sont utilisés afin de réduire le risque de récurrence et sont admis de tous :

- Favoriser la fixation par des fils non résorbables en point séparés,

- Fixer la prothèse préférentiellement aux structures osseuses et musculaires et non tendineuses,
- Découper une prothèse plus grande que le défaut, et faire des points larges de fixation sur la prothèse et sur les tissus hôtes,
- Ne jamais « tendre » la prothèse lors de sa fixation, éventuellement la modeler en forme de dôme (33).

## **b) Etat des lieux sur les prothèses dans la prise en charge des hernies diaphragmatiques congénitales**

La littérature est riche en études évaluant les résultats des chirurgies selon le type de matériaux utilisés et en études préliminaires sur des travaux de recherche. Classiquement, les prothèses sont classées selon leur caractère résorbable ou non. Ce chapitre sera basé sur l'analyse d'articles récents faisant l'état des lieux des prothèses utilisées dans cette indication et sur la médecine régénérative (32, 34).

### **i) Le polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE, Trademark, Gore-Tex®)**

C'est le matériau synthétique qui fait référence dans cette indication actuellement, puisqu'il est utilisé dans plus de 75 % des cas (26, 35).

Ce matériau découvert en 1938 est un polymère de  $C_2F_4$ . C'est en 1969 que RW Gore développe le e-PTFE issu de l'expansion du polymère de Téflon. Sa structure fibrillaire détermine sa porosité. La taille des pores (d'une moyenne de 30  $\mu m$  pour le Goretex®) peut être modulée en agissant sur la température ou les paramètres d'élongation lors des procédés d'expansion (36). Cette structure fibrillaire lui confère une grande résistance à la traction avec par exemple, une résistance à la rupture de 69 MPa pour une membrane ayant une microporosité de 90 %. Enfin c'est un polymère hydrophobe.

Les prothèses utilisées dans notre indication ont une épaisseur de 2 mm et présentent deux faces distinctes, une face structurée et une dite lisse permettant d'induire des réponses biologiques différentes sur chacune d'elles (figure 11). Ces prothèses sont commercialisées sous le nom de Goretex Dualmesh® (PTFE, Trademark, Gore-Tex® [W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ]).

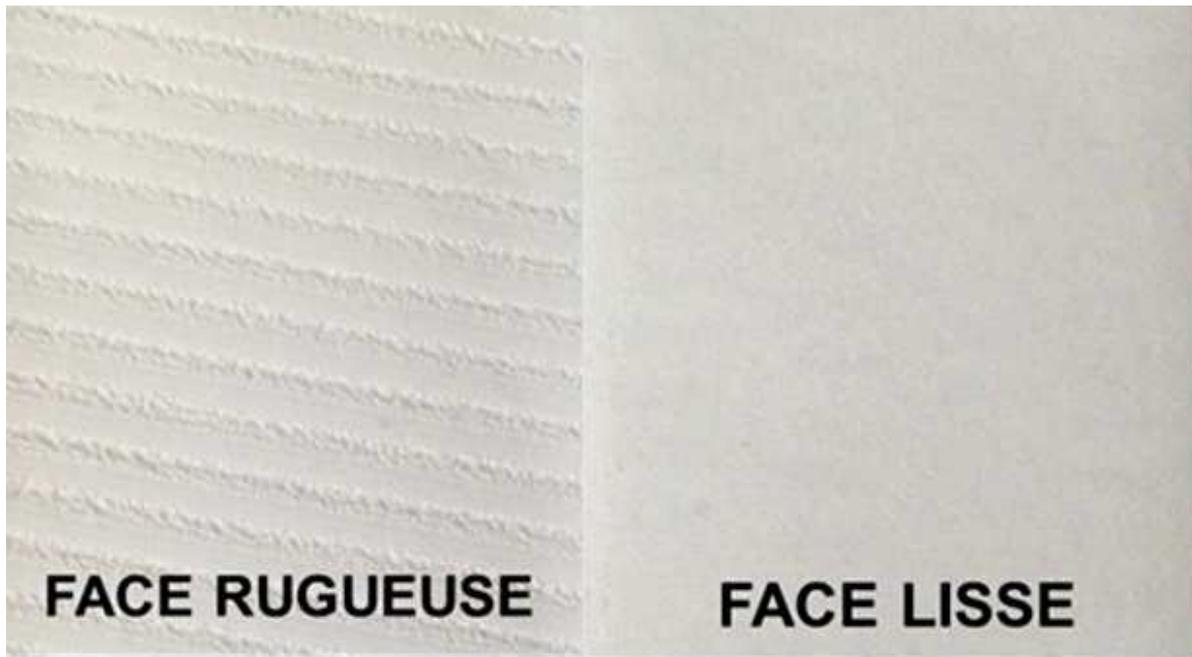


Figure 11 : illustration d'une prothèse de Goretex Dualmesh® 2mm

La face lisse sera positionnée sur le versant abdominal puisque sa surface faite de micropores de diamètre inférieur à 3  $\mu\text{m}$  limitera au maximum les phénomènes d'adhérences (37). A l'inverse, la face dite rugueuse, macroporeuse (avec des pores compris entre 30 et 60  $\mu\text{m}$ ) sera positionnée sur le versant thoracique. Elle favorise la migration cellulaire, la formation de tissu de granulation (36). Il a été décrit que des matériaux avec des pores inférieurs à 75  $\mu\text{m}$  étaient plus sujets à l'encapsulation alors qu'au-delà de 100  $\mu\text{m}$ , il y aurait une véritable intégration tissulaire (36).

## ii) Les autres prothèses et travaux de recherche

L'association de PTFE avec du polypropylène monofilament macroporeux (Marlex™, CR Bard, Murray Hill, NJ) donne une prothèse dite composite, biface également, avec le positionnement de la prothèse de telle sorte que le PTFE protège des adhérences abdominales et le polypropylène favorise la colonisation tissulaire sur le versant thoracique

afin d'optimiser l'intégration de la prothèse et éviter les récurrences (figure 12). Une étude récente utilisant cette technique suggère un artifice de fixation dite en sandwich en plus de l'utilisation d'une prothèse composite pour diminuer le risque de récurrence lors d'une prise en charge par thoracoscopie (38).

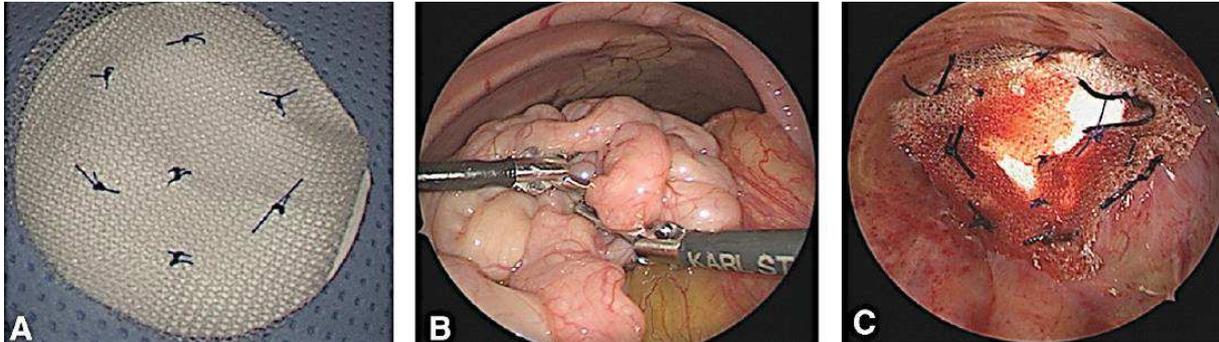


Figure 12 : illustration d'une prothèse composite associant PTFE et Polypropylène (A) Gore-Tex/Marlex. (B) vue peropératoire d'une HDC. (C) fixation "sandwich de la prothèse composite. Tiré de Kamran A and al (38)

Les matériaux biologiques résorbables sont attractifs de part leur caractère biologique, à commencer par le Surgisis®. Il s'agit de sous-muqueuse intestinale de porc décellularisée formant une matrice extracellulaire de collagène de type 1 riche en facteur de croissance, faisant le lit d'une colonisation par le tissu hôte (39). Cependant, la présence d'ADN de porc génère une réaction inflammatoire importante et la résorption est considérée comme trop rapide avec un risque secondaire de récurrence précoce. Une méta-analyse récente conclut à l'absence de différence significative en termes d'incidence des récurrences entre PTFE et Surgisis® dans notre indication, avec toutefois, l'impression là-encore de récurrences plus précoces avec le Surgisis® (40).

L'AlloDerm® (Lifecell corporation, Branchburg, NJ) appartient à la même catégorie de prothèses biologiques acellulaires, composée cette fois d'une matrice extracellulaire provenant de derme humain cadavérique, purifiée des éléments immuns, non « cross linkée » pour favoriser une colonisation néovasculaire et cellulaire par l'hôte. Sa résorption très rapide, qui doit être compensée par une régénération du tissu hôte tout aussi rapide et solide rend

son utilisation extrêmement rare dans cette indication, le risque de récurrence précoce étant majeur.

Le Permacol® (Covidien, AG) est une matrice collagénique décellularisée de derme de porc avec réticulation HDMI (hexaméthylène diisocyanate) augmentant ainsi sa résistance en s'opposant à l'action des enzymes collagénases. Une étude rapporte son utilisation chez 8 patients sans survenue de récurrence sur 20 mois mais finalement sans supériorité par rapport au PTFE (41).

Enfin au moins 2 matériaux sont au stade de l'expérimentation animale :

Surgimend® qui est une matrice collagénique acellulaire de derme bovin fœtal. Sa particularité tient dans sa richesse en collagène de type III connu pour son rôle essentiel dans la migration des fibroblastes et la maturation des fibrilles de collagène. Les résultats expérimentaux semblent prometteurs avec une réparation tissulaire rapide par l'hôte sans réaction inflammatoire majeure (42).

Le PLGA (poly-lactico-co-glycolic acid mesh collagen sponge hybrid scaffold) conçu pour une résorption sur 3 mois. Une étude expérimentale sur un modèle de hernie diaphragmatique a montré un néodiaphragme épais, sans récurrence mais dépourvu de cellules musculaires (43).

Ainsi, la prothèse optimale n'existe pas et finalement, la pathologie herniaire diaphragmatique relève des défis thérapeutiques dits de bioingénierie tissulaire ou remplacement d'organe. L'ingénierie tissulaire est basée sur trois fondamentaux : les cellules, la matrice extracellulaire et son architecture tridimensionnelle, les facteurs de prolifération au sens large. Ainsi des équipes axent actuellement leur recherche sur les cellules souches et leur capacité à se différencier en divers types cellulaires et précisément ici, en cellules musculaires. Concernant le tissu musculosquelettique, l'intérêt se porte sur les cellules satellites, seules capables de fournir des précurseurs myogéniques (44). Récemment, une membrane associant un gel de

silice poreux greffé de facteur VEGF et des myoblastes mis en culture sur une matrice diaphragmatique acellulaire a pu être implantée sur un modèle expérimental de hernie diaphragmatique chez le rat lewis. A 8 semaines, le résultat est encourageant avec mise en évidence de cellules multinucléées et de fibres cholinergiques au sein du patch ainsi qu'une activité proangiogénique (45).

Les cellules dérivées de la moelle osseuse ont elles aussi été testées avec des résultats peu encourageants, leur seul effet étant probablement de stimuler les cellules satellites (46).

En 2016, un essai encourageant a consisté à réséquer 80 % de la surface diaphragmatique gauche d'un rat, puis d'implanter un patch de diaphragme décellularisé ensemencé en cellules stromales mésenchymateuses de moelle osseuse (47). A 3 semaines, les tests montraient une vraie mobilité diaphragmatique et une histologie proche de l'histologie normale du diaphragme murin. D'autres cellules précurseurs ont été testées ; seules les cellules souches embryonnaires ont montré leur capacité à se différencier en cellules satellites en étude expérimentale, avec toute la retenue habituelle que l'on peut avoir quant à une application clinique à venir (48). Dans une même logique, les cellules souches dérivées du liquide amniotique sont une alternative séduisante ce d'autant qu'elles sont d'accès facile par la réalisation d'une amniocentèse, examen systématiquement réalisé dans le cadre du bilan malformatif lors d'un diagnostic fœtal de hernie diaphragmatique congénitale. Ainsi ces cellules sont récupérées suite à une amniocentèse, mises en culture dans des conditions bien spécifiques durant la grossesse, afin d'obtenir idéalement un patch musculaire homologue, disponible à la naissance pour la réparation herniaire. Fauza et al ont développé cet axe pour générer un tendon diaphragmatique avec des résultats encourageants (49). Ces cellules représentent 1 % des cellules retrouvées dans le liquide amniotique des amniocentèses et peuvent être sélectionnées par immunomarquage CD117 (50).

## **2) DEFINITION DU CAHIER DES CHARGES D'UNE PROTHESE OPTIMALE**

Ainsi, on l'aura compris, la prothèse optimale n'existe pas et actuellement, c'est le Goretex qui fait référence puisque ce matériau constitue un compromis convenable entre caractéristiques biologiques et biomécaniques. Seules deux études font l'analyse microscopique d'une prothèse implantée au niveau du diaphragme chez l'animal avec, pour l'un la mise en évidence d'un infiltrat fibroblastique de la prothèse à 4 mois de la pose et une incorporation à 7 mois chez le chien (51) et pour l'autre, une réaction inflammatoire importante et un décollement du tissu hôte à l'interface prothèse-diaphragme natif chez l'agneau (52).

Afin de comprendre son intégration dans cette indication bien spécifique qu'est la réparation d'une hernie diaphragmatique congénitale de nouveau-né, nous avons voulu, d'une part, analyser l'ultrastructure et les caractéristiques biomécaniques du e-PTFE à l'état natif, et plus précisément les membranes Dualmesh® 2mm que nous utilisons comme prothèse diaphragmatique, et d'autre part, faire l'analyse d'explants de récurrence herniaire.

### **a) Analyse du e-PTFE natif**

#### **i) Analyse ultrastructurale**

##### **(1) Calcul de l'angle de contact**

Pour les mesures d'angle de contact statique, 3  $\mu$ L d'eau distillée ( $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) ont été déposés sur la surface du côté air de la membrane de e-PTFE à la température ambiante et

l'angle de contact a été mesuré après 10 secondes. Les valeurs données correspondent à la moyenne sur  $n = 10$  mesures. Un goniomètre OneAttension équipé du logiciel OneAttension 3.1 et d'un logiciel d'acquisition d'images a été utilisé pour ces mesures (Biolin Scientific). Nous retrouvons des valeurs équivalentes à celles fournies par le fabricant Gore soit un angle de contact dans ces conditions de  $121^\circ \pm 3^\circ$  (figure 13).

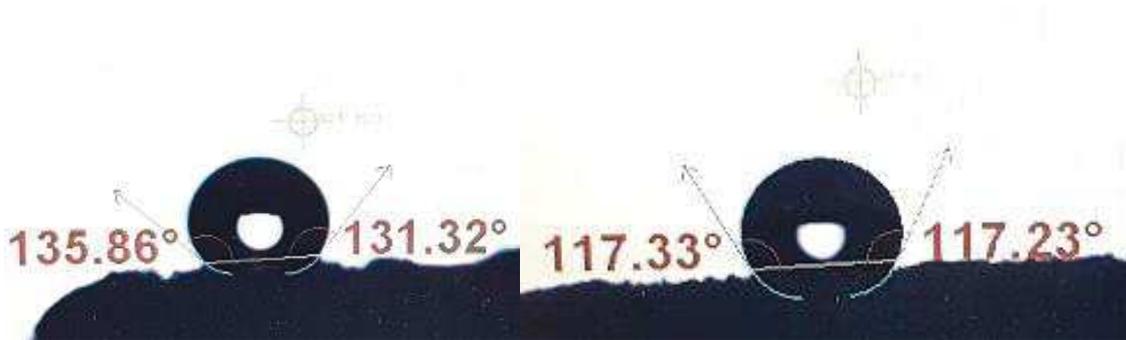


Figure 13 : deux exemples de mesure d'angle de contact sur e-PTFE en air ambiant

## (2) Analyse en microscopie électronique à balayage (MEB)

Des patches de  $1 \text{ cm}^2$  de e-PTFE ont été métallisés avec un alliage Au/Pd (Humer Junior, Siemens, Karlsruhe, Germany) et analysés sur leurs 2 faces avec un microscope Quanta FEG-250 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands).

Nous l'avons vu précédemment, ce matériau présente 2 faces distinctes.

La face lisse (figure 14) :

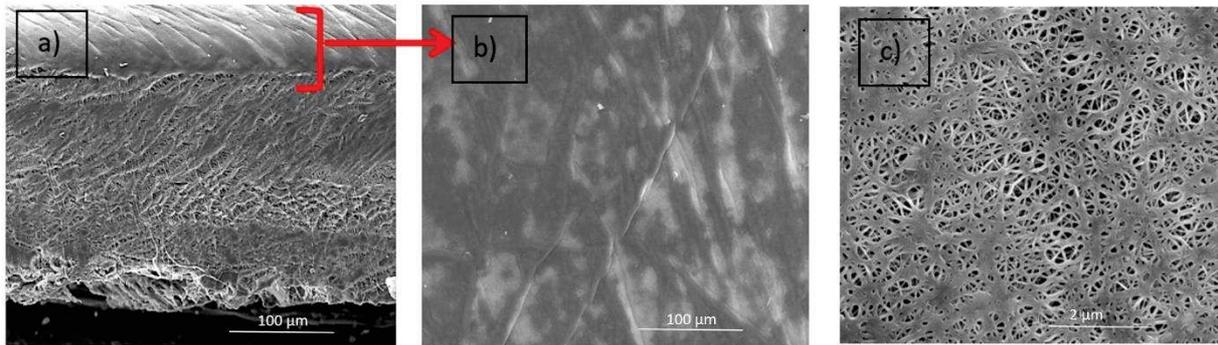


Figure 14 : micrographie en MEB de e-PTFE : a) en tranche x 250 ; b) face lisse x 250 ; c) : face lisse x 10 000

L'analyse de la tranche du e-PTFE est difficile à réaliser (même en cryosection) à cause de la consistance très molle du produit. Les meilleures images sont obtenues après inclusion dans de la résine et réalisation de coupes semi-fines avec un ultra-microtome automatique Reichert Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé d'un couteau en diamant.

La face lisse est uniformément poreuse, constituée de filaments qui convergent en des noeuds plus denses. Les pores interfibrillaires sont inférieurs à 3 µm.

La face rugueuse (figure 15) :

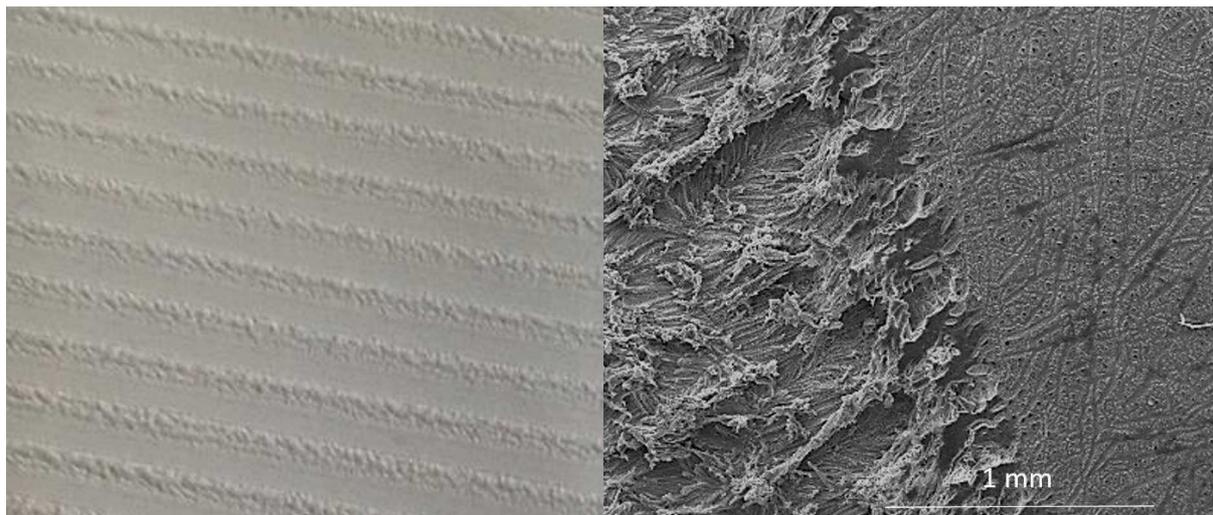


Figure 15 : Photographie de e-PTFE, face rugueuse

Micrographie en MEB de e-PTFE, face rugueuse x 100

Elle est composée d'une alternance de bandes de textures différentes (lisses et rugueuses) d'une largeur de 1,5 mm chacune. Les bandes lisses ont une structure homogène et poreuse se rapprochant de l'architecture de la face lisse mais dont les filaments sont plus larges et les nœuds plus épais. Les pores ont une taille d'environ 10  $\mu\text{m}$ . Les bandes rugueuses quant à elles ont une structure très hétérogène, faite de filaments enchevêtrés, larges (figure 16 et 17).

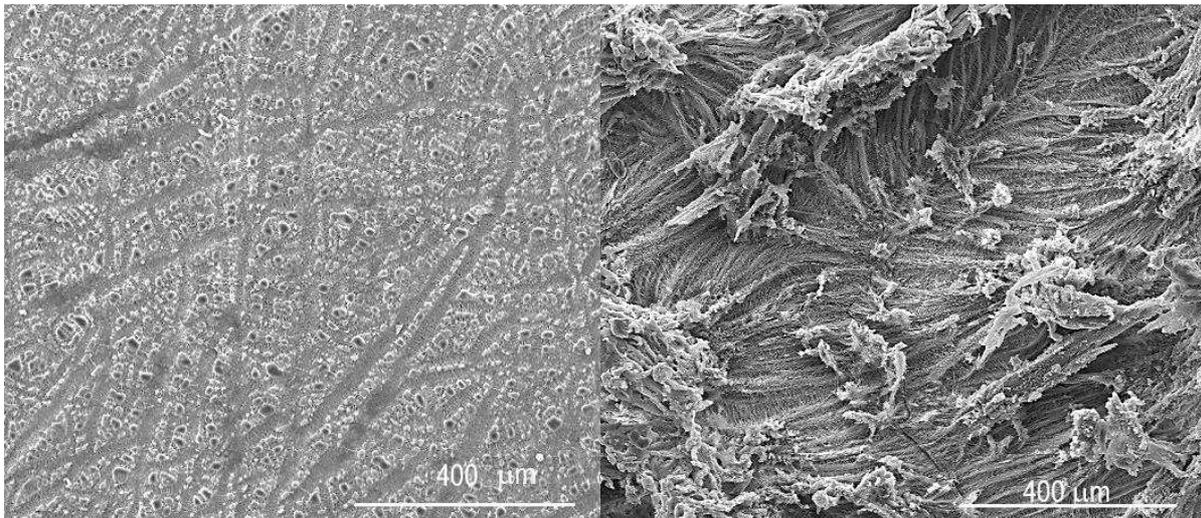


Figure 16 : micrographie en MEB : Bande lisse (à gauche) et rugueuse (droite) de la face rugueuse du e-PTFE ; x 250

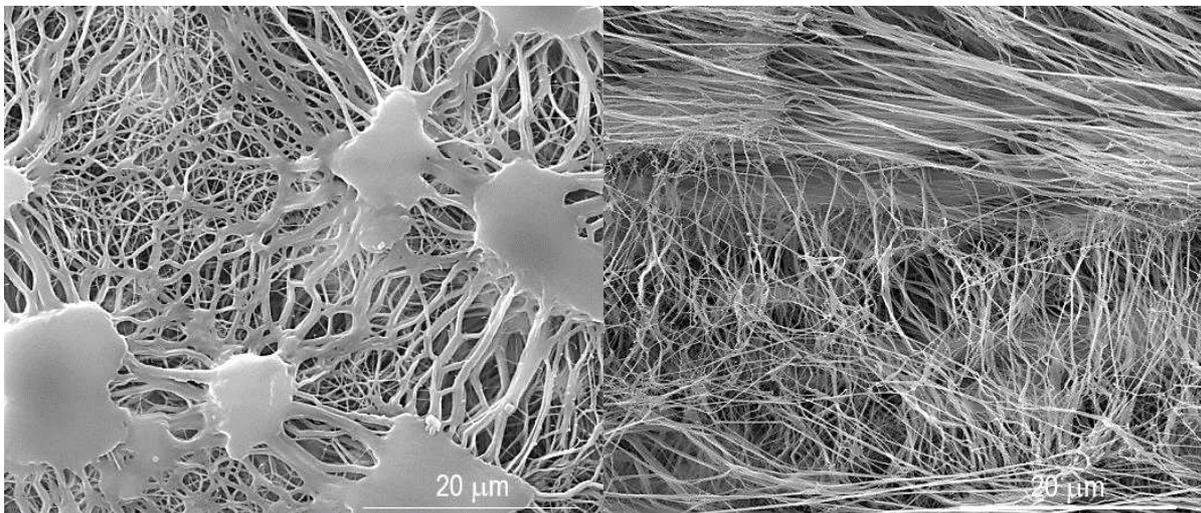


Figure 17 : micrographie en MEB : Bande lisse (à gauche) et rugueuse (droite) de la face rugueuse du e-PTFE ; x 5000

Nous retrouvons bien une différence nette de la surface et de la porosité entre les deux faces de la prothèse, influençant très probablement et la réponse biologique de l'hôte sur chacune des deux faces et le comportement biomécanique de la prothèse à court et long terme.

### **(3) Analyse en microscopie à force atomique (AFM)**

La microscopie à force atomique permet l'étude de la surface des matériaux à l'échelle des atomes. Elle repose sur l'analyse de l'interaction entre le matériau et une sonde de taille nanométrique. Ainsi nous obtenons par balayage de la surface d'un échantillon, une caractérisation chiffrée et imagée des propriétés physicochimiques et mécaniques des échantillons. Nous réaliserons l'ensemble de nos analyses AFM avec un AFM Bioscope Catalyst (Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA USA). Une pointe pyramidale, ayant un rayon de courbure d'une dizaine de nanomètres et fixée au bout d'un cantilever, explore la surface de l'échantillon qui peut être déplacé dans les trois directions de l'espace grâce à des céramiques piézoélectriques. Un faisceau laser est focalisé sur le dos réfléchissant du cantilever. Le faisceau réfléchi est orienté vers un photodétecteur qui permet de mesurer les déplacements du cantilever. Pour les mesures en spectroscopie de force, la céramique piézoélectrique est soumise à un signal électrique en dent de scie et, dans ce cas de figure, ce sont les déflexions en Z qui sont enregistrées. On obtient ainsi des courbes de force où la déflexion du cantilever (Force) est tracée en fonction du déplacement de la céramique piézoélectrique (du spécimen) de retrait. L'analyse de la phase d'approche permet d'accéder à des propriétés mécaniques (élasticité notamment) de l'objet, alors que la phase de rétraction produit des courbes de force qui traduisent les phénomènes de détachement survenant après l'interaction entre les éléments en présence (forces de rupture).

Pour l'imagerie AFM, nous avons employé le mode ScanAsyst<sup>®</sup> qui est une technique d'optimisation d'imagerie. Le mode ScanAsyst<sup>®</sup> est basé sur le mode intermittent «

PeakForce® ». Dans ce mode d'observation, la sonde (pointe) « frappe » périodiquement l'échantillon et la force d'interaction est mesurée directement par la déflexion du cantilever. La boucle de rétroaction maintient la force d'appui constante et aussi faible que 10 pN, dans l'air comme en phase liquide ; ce qui est significativement plus faible que la valeur utilisée par les autres modes d'observation, comme le « Tapping » (~ 1 nN). Le mode « PeakForce® » est particulièrement intéressant pour les spécimens biologiques. Ce mode d'observation est beaucoup moins « traumatisant » pour l'échantillon.

Les mesures d'élasticité sont effectuées en phase liquide à température ambiante sur différentes zones de l'échantillon. Les expériences de nanoindentation consistent à soumettre l'échantillon à des séries de cycles approche-retrait d'une sonde colloïdale sphérique en borosilicate de 10 µm de diamètre. Le contact est initialement ponctuel, et il s'élargit au fur et à mesure de l'enfoncement. Par conséquent, la surface de contact augmente avec l'enfoncement. La raideur du cantilever est déterminée par la méthode de fluctuation thermique (53). Les mesures sont réalisées à des vitesses d'approche et de retrait constants. Les courbes de force enregistrées sont ensuite analysées avec le logiciel NanoScope Analysis (Bruker Corporation, Santa Barbara, CA USA). Les modules élastiques ou module de Young des échantillons sont déterminés en utilisant le modèle de Hertz (54). Rappelons que ces modules se définissent par le rapport d'une contrainte à la déformation élastique provoquée par cette contrainte.

Nous avons ainsi déterminé le module élastique du Goretex Dualmesh natif afin de pouvoir le comparer à celui que nous obtiendrons sur les explants. Par technique de nanoindentation en AFM, le module de Young (E) obtenu est de  $295 \pm 43,6$  kPa.

## ii) Analyse biomécanique

Afin de connaître les propriétés biomécaniques du e-PTFE et de pouvoir ultérieurement le comparer à un biomatériau innovant, nous avons pratiqué deux types de test : des tests de traction uniaxiale et une analyse au MEB sous étirement. Ce travail a été mené conjointement avec le Dr Anne Schneider lors de notre année commune de doctorat au sein du laboratoire. Ainsi la description des manipulations et les résultats sont également présents dans son manuscrit de thèse.

### (1) Test de traction unidirectionnel

Ceux-ci ont été réalisés au sein du Laboratoire ICube, département de mécanique Matériaux MultiEchelles et Biomécanique MMB de Strasbourg avec l'aide du Pr Nadia BAHLOULI.

Nous avons donc préparé des éprouvettes de e-PTFE selon les normes européennes EN ISO 527-3 (*Plastiques – Détermination des propriétés en traction – Partie 3 : conditions d'essai pour films et feuilles (ISO 527-3 : 1995)*) (figure 18). La longueur entre les mors est normalement de 100 mm. Cependant ne pouvant produire des biomatériaux d'une telle longueur, nous avons fait le choix de réduire la longueur initiale d'un facteur 5 en respectant le ratio  $R = \text{épaisseur} / \text{longueur initiale}$  ( $0.1 \leq R \leq 0.25$ ). Deux types d'éprouvettes sont préparés selon l'orientation des bandes de la face rugueuse ( $0^\circ$  ou  $90^\circ$ ) afin de définir un éventuel impact de l'orientation de ces bandes dans la résistance du PTFE aux forces de traction uniaxiale (figure 19).

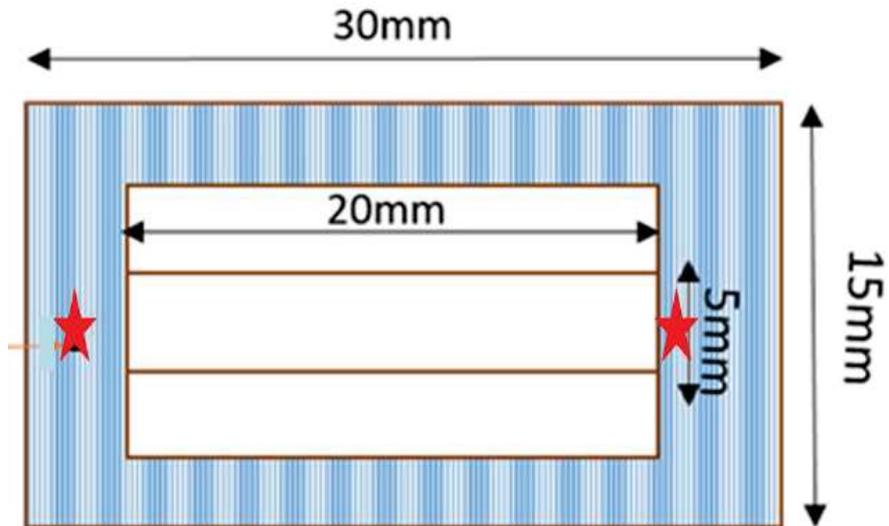


Figure 18 : en haut, méthode de fixation d'une éprouvette pour l'essai de traction uni-axiale (étoiles : points de colle). En bas, photo d'une éprouvette avant traction

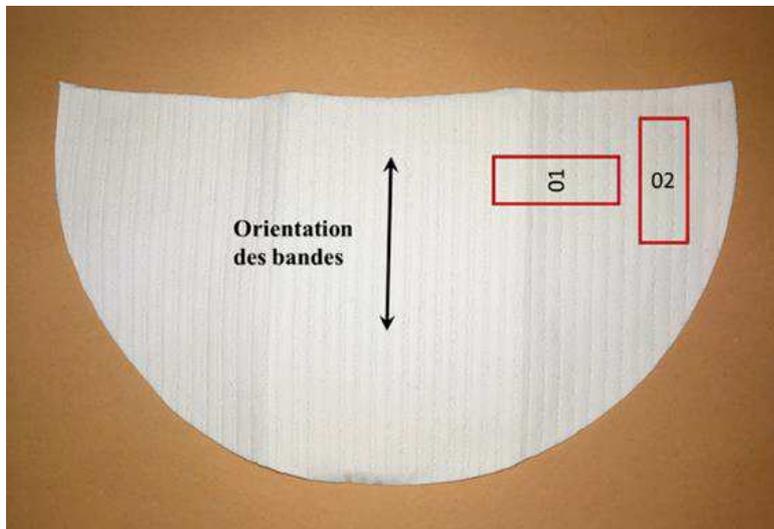


Figure 19 : préparation des éprouvettes de e-PTFE en fonction de l'orientation des bandes sur la face rugueuse (flèche : axe parallèle aux bandes rugueuses) : groupe 01 : perpendiculaire à l'axe ( $90^\circ$ ) ; groupe 02 : parallèle à l'axe ( $0^\circ$ )

Les essais de traction uni-axiale sont réalisés sur une machine de traction MTS, équipée d'une cellule de force de 100 N, à la vitesse de 5 mm/Min (figure 20). Tous les essais sont réalisés

dans les mêmes conditions. La force  $F$  est donnée en newton (N).  $A$  correspond à l'unité de surface de la section de l'éprouvette, en  $\text{mm}^2$  ;  $L_0$  définit la longueur initiale entre les mors et  $\Delta L$  l'allongement en mm.

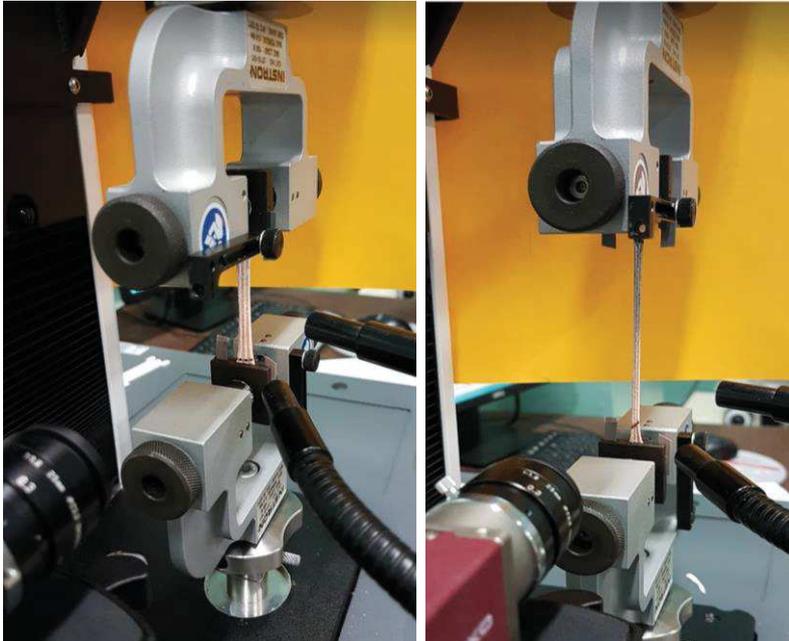


Figure 20 : machine de traction MTS, équipée d'une cellule de force de 100 N

Pour les petites déformations, les courbes de contrainte ingénieure  $\sigma_l$  en MPa ( $\sigma_l = F / A$ ) en fonction de la déformation ingénieure  $\epsilon_l$  ( $\epsilon_l = (\Delta L / L_0) \times 100$ ) sont calculées . Nous pouvons en déduire la contrainte maximale avant rupture ( $\sigma_v = \sigma_l \times (1 + \epsilon_l)$ ) et le module de Young  $E$  en MPa ( $E = \sigma / \epsilon$ ) calculé sur la partie linéaire de la courbe contrainte/déformation ingénieure (figure 21).

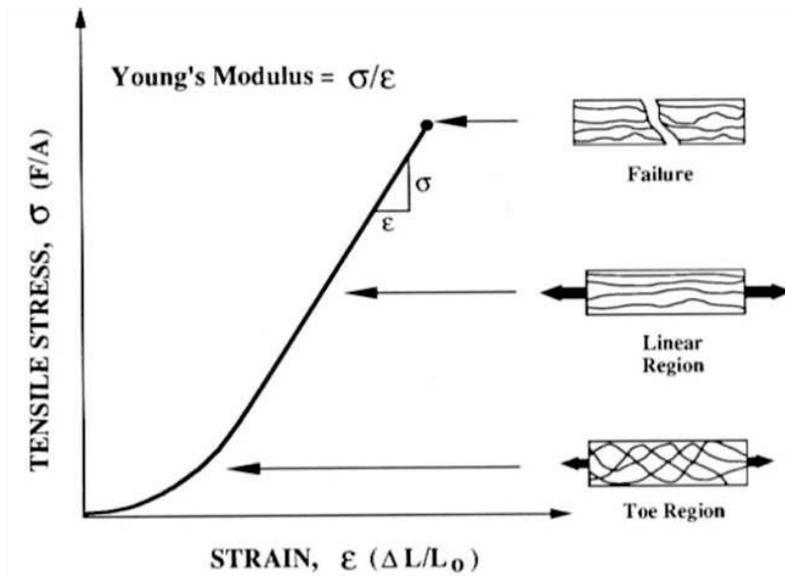


Figure 21 : exemple de courbe de contrainte  $\sigma$  / déformation  $\epsilon$  ingénierie et calcul du module de Young ( $\sigma/\epsilon$ ) d'un tissu biologique, d'après Korhonen and al (55).

Quelques courbes de contrainte/déformation sont présentées plus bas ainsi que les résultats (tableau 1 et figure 22). Pour la contrainte, la déformation et E sont très proches entre le groupe 01 (90°) et le groupe 02 (0°) ; nous pouvons donc en déduire qu'il n'y a pas d'influence de l'orientation des bandes. Ceci concorde avec nos observations en microscopie photonique du goretex dualmesh lors d'analyse d'explant, où nous avons pu observer que ce biomatériau n'est texturé qu'en surface sur sa face rugueuse et que sa structure poreuse centrale est homogène.

	Groupe 01	Groupe 02
<b>Contrainte rationnelle maximale</b>	27,9	29,8
<b>moyenne en MPa (écart-type en %)</b>	(± 9,0)	(± 9,3)
<b>Déformation ingénierie maximale</b>	186,6	172,0
<b>moyenne en % (écart-type en %)</b>	(± 75,1)	(± 44,3)
<b>E en MPa (écart-type en %)</b>	15,6	14,7
	(± 1,0)	(± 0,8)

Tableau 1 : résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du e-PTFE (groupe 01 : 90° ; groupe 02 : 0°)

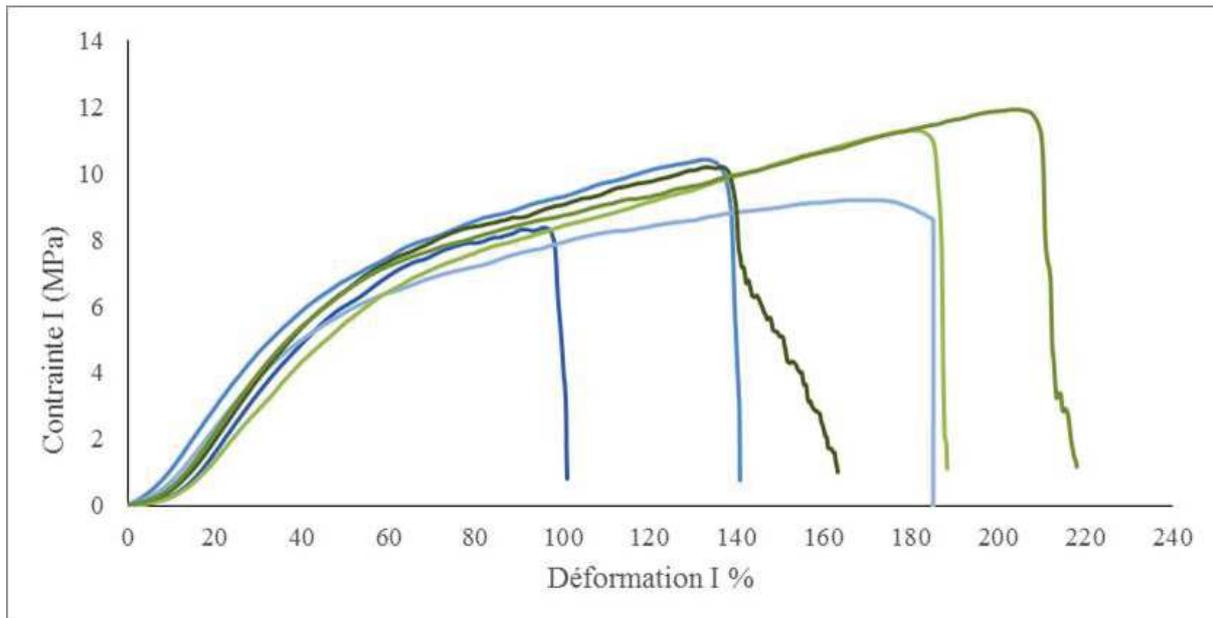


Figure 22 : courbes de contrainte/déformation ingénierie du e-PTFE en fonction de l'orientation des bandes à la surface de sa face rugueuse (groupe 01 : bleu ; groupe 02 : vert)

Ces courbes montrent bien le comportement linéaire initial du e-PTFE traduisant un comportement élastique où les fibrilles agissent potentiellement comme des structures élastiques. Puis, progressivement, le matériau passe à un comportement plastique, où la structure se rompt (36). Ces résultats sont en accord avec les données fournies par le fabricant puisqu'il est admis que le e-PTFE peut se déformer en longueur jusqu'à 100 % ou plus.

Concernant cette notion de résistance à la traction, en pratique clinique courante, il est improbable que les tissus soient soumis à de telles contraintes à court terme. En effet, les contraintes imposées à court terme par la ventilation sont minimes, alors que les forces de traction qui résultent de la croissance du porteur de la prothèse, et qui s'appliquent aux tissus et à l'implant sur le long terme, sont bien plus importantes. Le diaphragme naturel s'adaptera progressivement à la croissance biologique ce qui ne sera pas le cas du e-PTFE. Il sera également essentiel de réaliser des essais de fluage et de relaxation pour comparer le comportement mécanique au long cours des biomatériaux par rapport à celui des tissus biologiques.

## (2) Test de traction sous MEB

Lors de la réalisation des tests de traction sur machine de traction MTS, nous avons pu constater la déformation des éprouvettes motivant une analyse au MEB. Sous l'effet des forces de traction, toutes les structures du e-PTFE décrites précédemment prennent une orientation unidirectionnelle (figure 23) et le biomatériau laisse entrevoir une trame fibrillaire sous-jacente unique (figure 24 et 25). Il existe une délamination progressive qui débute au niveau des bandes rugueuses. Dans la littérature, il est ainsi décrit une déstructuration du e-PTFE avec une élancement des nœuds dans le sens de la traction et un allongement des fibrilles (36).

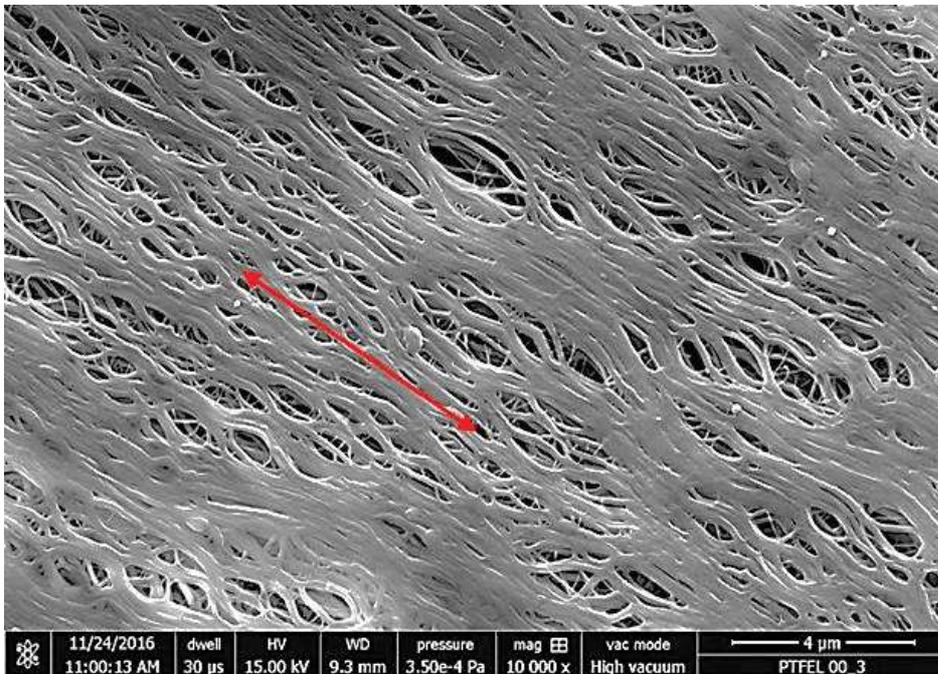


Figure 23 : micrographie en MEB : Face lisse du e-PTFE après traction uni-axiale (flèche : axe d'étirement)

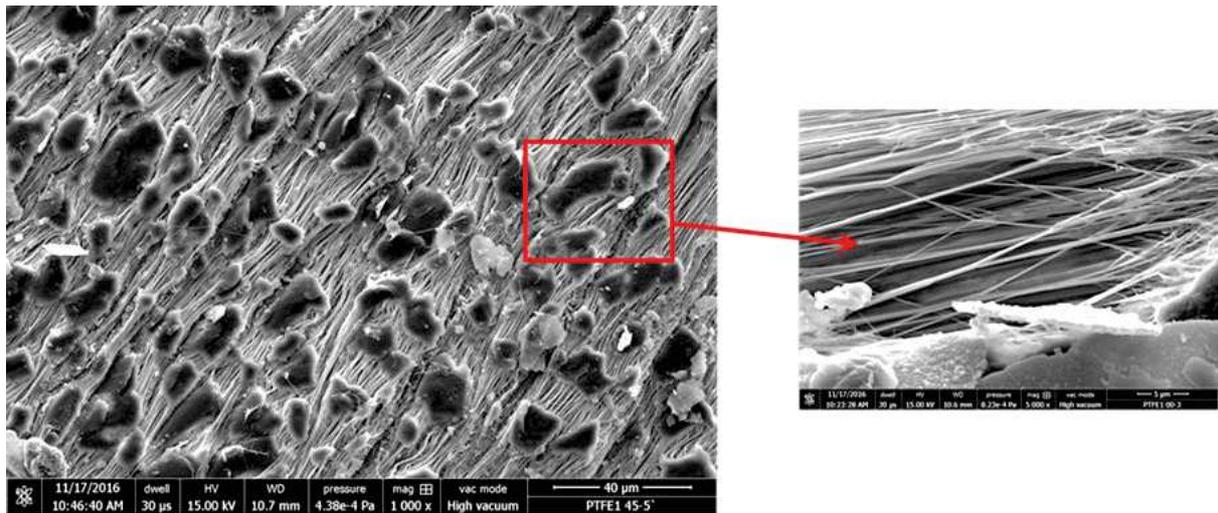


Figure 24 : micrographie en MEB : Bande lisse de la face rugueuse du e-PTFE soumis à un étirement uni-axial. L'agrandissement de la figure de droite montre l'alignement des fibres de e-PTFE

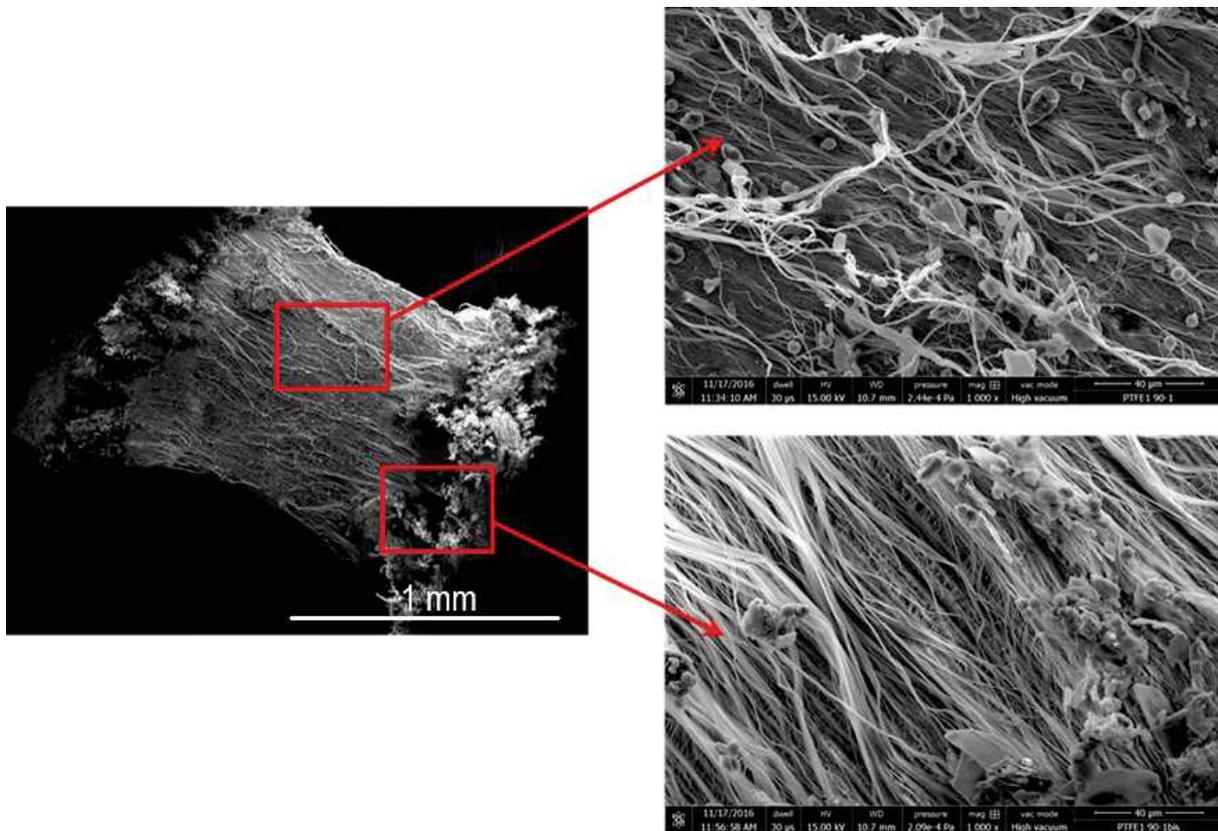


Figure 25 : micrographie en MEB : Bande rugueuse de la face rugueuse du e-PTFE après traction uni-axiale. La figure de droite (haut) montre un agrandissement de la zone centrale de la bande rugueuse et la figure de droite (bas) montre un agrandissement de la zone de transition entre bande rugueuse et bande lisse où l'alignement des fibres est plus important

Secondairement, nous avons réalisé un étirement sous MEB, prenant en compte une fois encore l'orientation des bandes de la face rugueuse. Ces tests ont été réalisés grâce à la mise au point d'une platine d'étirement uniaxiale pouvant être introduite dans le MEB (figure 26).

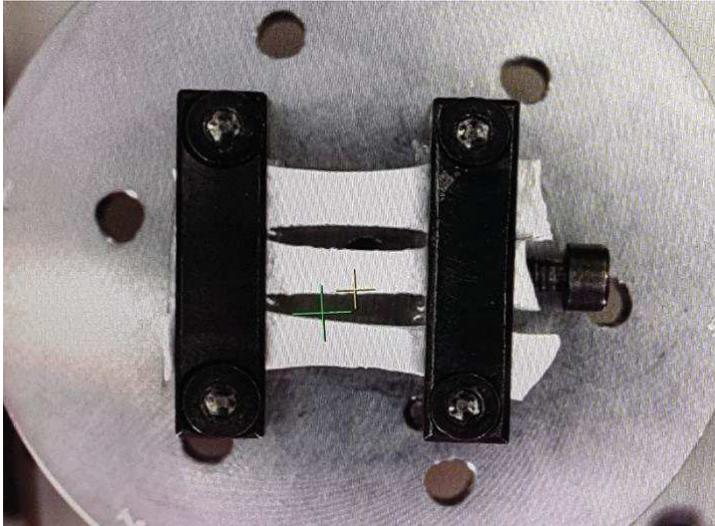


Figure 26 : platine d'étirement placée au MEB

Dans le MEB, la longueur initiale des échantillons est limitée à 7 mm afin de pouvoir aller jusqu'à 100 % d'étirement. Nous ne respectons plus les normes employées sur le banc de traction mais devons répondre aux contraintes de la taille du système introduit dans la chambre du MEB. Afin de ne pas avoir à métalliser les éprouvettes de traction, nous ferons les analyses en mode « low vacuum » (vide partiel).

Ainsi, dès 10 % d'étirement uniaxial (figure 27), les structures du e-PTFE en regard des bandes lisses de la face rugueuse prennent une orientation unidirectionnelle dans le sens de la contrainte de traction : les nœuds interfibrillaires ne changent pas de forme dans un premier temps mais la trame fibrillaire qui les relie s'allonge et s'étire précocement; les fibrilles s'orientent toutes parallèlement les unes aux autres laissant apparaître, en profondeur une trame fibrillaire encore respectée en début d'étirement. Au fur et à mesure que l'étirement augmente, celle-ci prend à son tour une orientation unidirectionnelle, s'allonge, alors que les fibrilles en surfaces se rompent (figure 28 à 30).

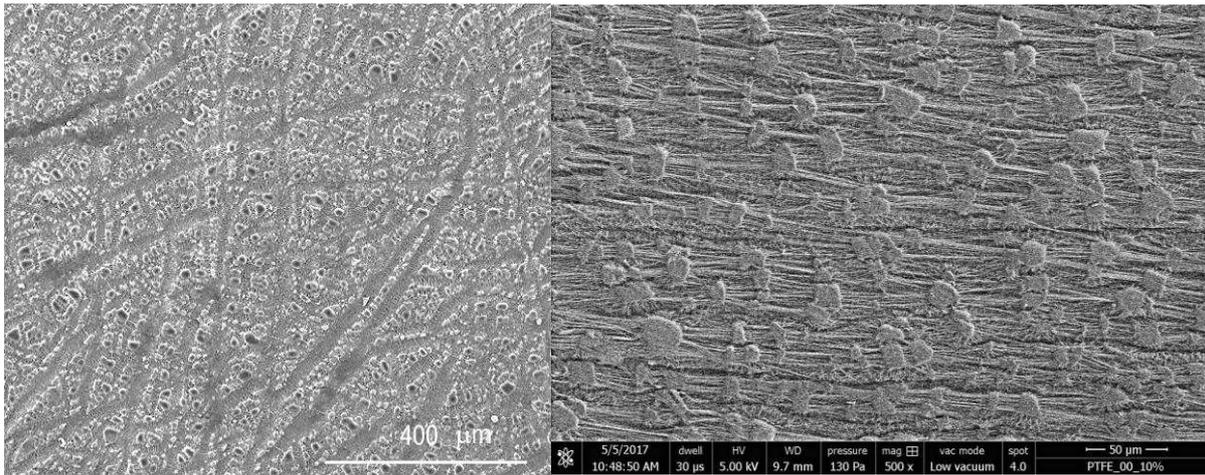


Figure 27 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; sans étirement (image de gauche ; x 1000) et étirement à 10 % (image de droite ; x 500)

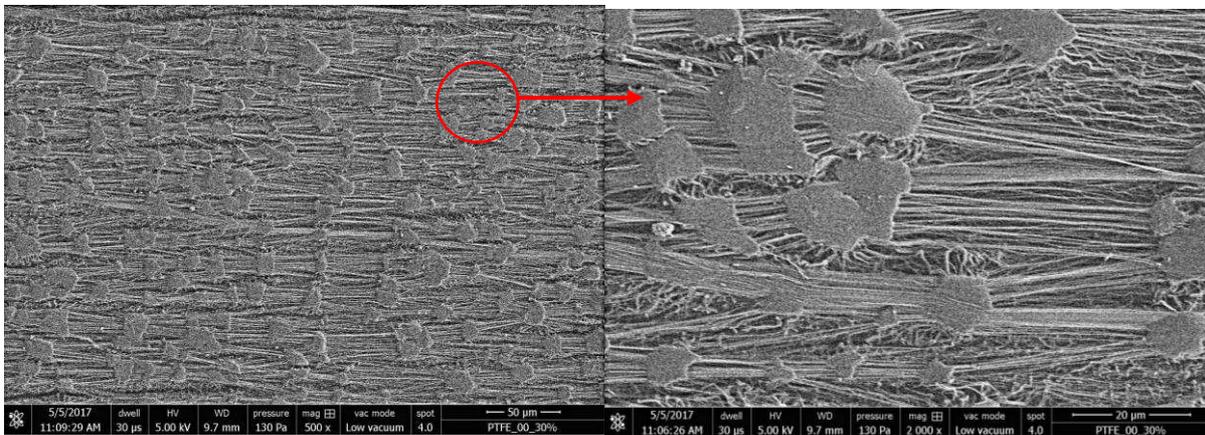


Figure 28 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse avec un étirement à 30 % (x 500 image de gauche ; x 2000 image de droite)

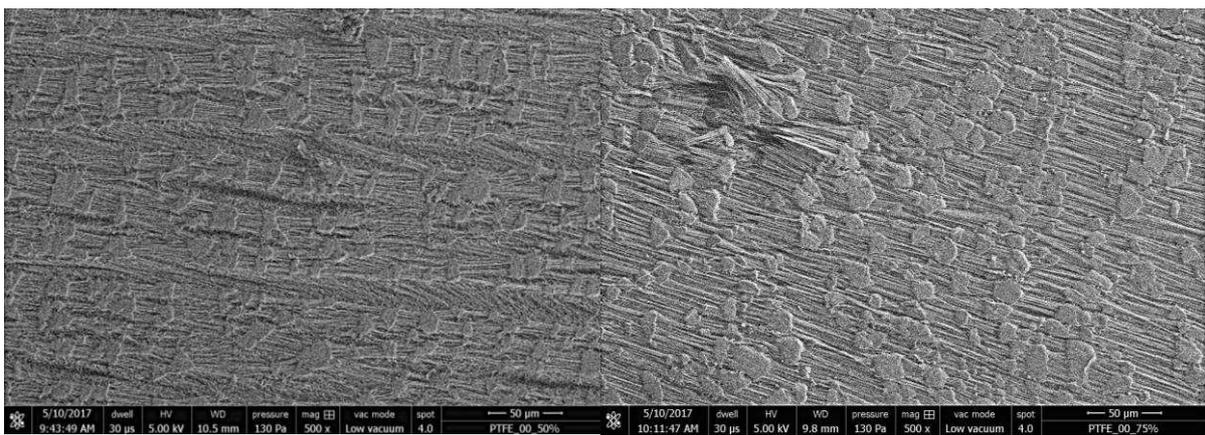


Figure 29 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; étirement à 50 % à gauche et 75 % à droite ; x 500

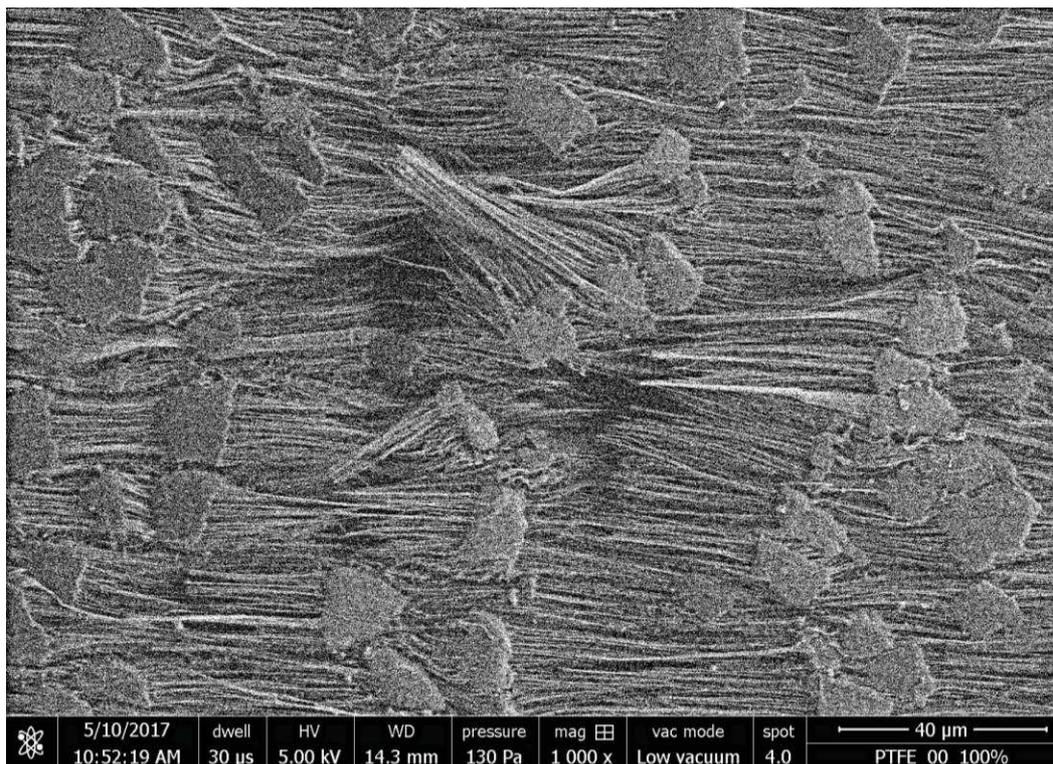


Figure 30 : micrographie en MEB du e-PTFE : bandes lisses de la face rugueuse ; étirement à 100 % ; x 1000

## b) Analyse des explants

Deux explants ont pu être analysés pour comprendre l'intégration du e-PTFE sous forme de Goretex Dualmesh® dans cette indication : l'un lors du doctorat du Dr Anne SCHNEIDER, le second lors de notre collaboration. Les analyses de ces deux échantillons étant sensiblement superposables, les résultats seront présentés indépendamment de leur origine. Il s'agit dans les deux cas de prothèses de Goretex Dualmesh® posées au deuxième jour de vie chez des nouveau-nés présentant une hernie diaphragmatique congénitale à large défaut à gauche. Tous deux ont présenté une récurrence herniaire par lâchage de prothèse motivant une reprise chirurgicale, pour l'un à 7 mois de vie, pour le second à 10 mois.

Les analyses histologiques sont menées sur trois zones (figure 31) : le centre de la prothèse (zone A), la périphérie de la prothèse sans lâchage (zone B), et la périphérie de la prothèse avec lâchage (zone C). Les échantillons sont analysés en MEB, MET et AFM.

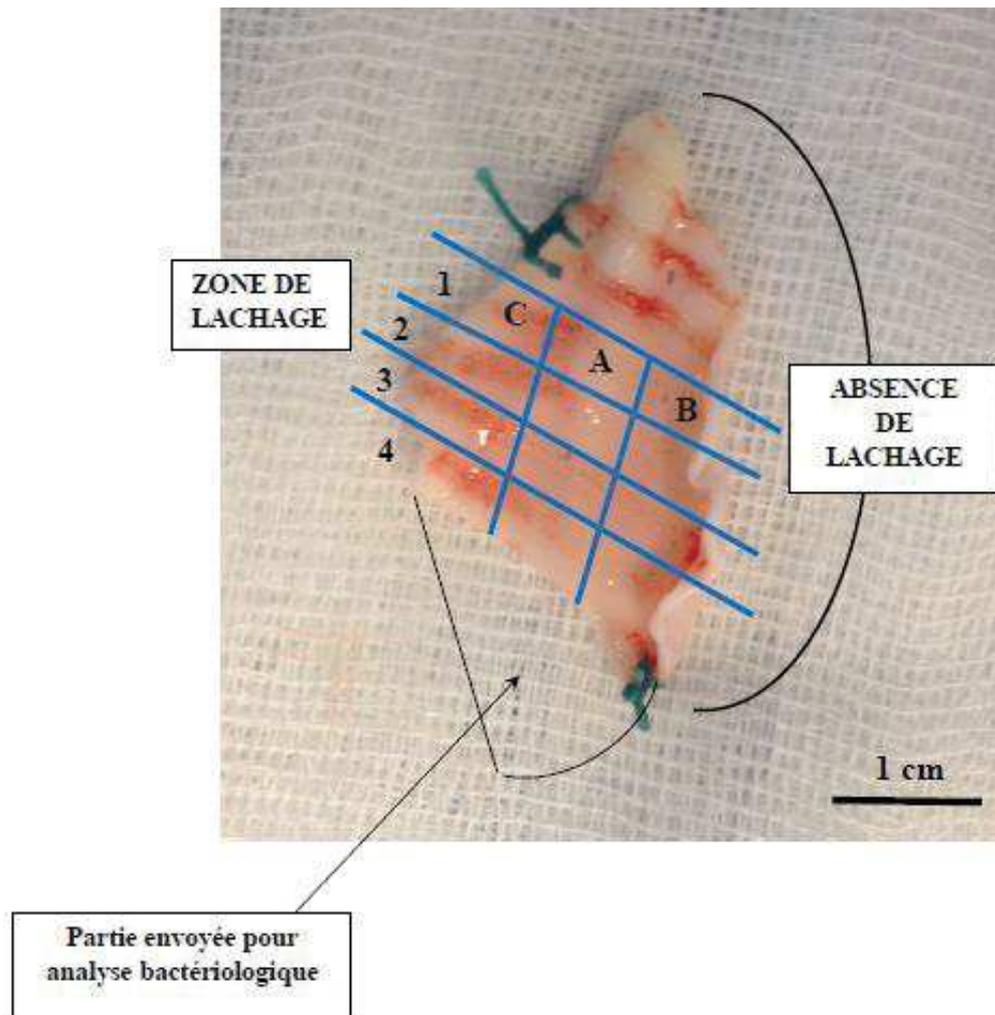


Figure 31 : explant n°2, vue de la face rugueuse. A : centre de la prothèse ; B : périphérie de la prothèse sans lâchage ; C : périphérie de la prothèse avec lâchage. 1 et 2: analyses MEB; 3: analyses MET; 4: analyses AFM. D'après A. Schneider

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié (56).

### i) Analyse au microscope photonique

L'analyse en microscopie photonique ou optique après coloration au bleu de toluidine (figure 32) a permis de confirmer la différence de réaction tissulaire de l'hôte au contact de chacune des deux faces avec un tissu de recouvrement nettement plus abondant sur la face rugueuse (versant thoracique) que sur la face lisse (versant abdominal) correspondant bien aux objectifs

du fabricant. A noter que nous objectivons la structure poreuse du Goretex Dualmesh® sur ces coupes.

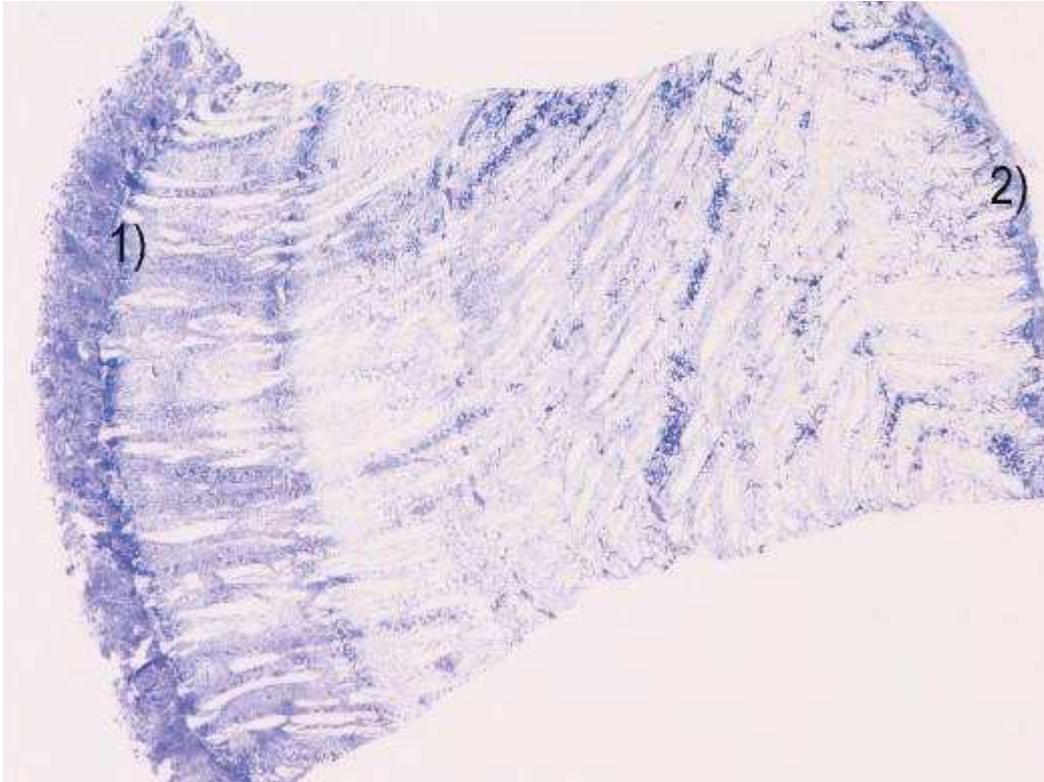


Figure 32 : microscopie optique. Coupe transversale de l'explant marqué au bleu de toluidine ; x 10. On constate l'abondance du tissu de recouvrement sur la face rugueuse (1) par rapport à la face lisse (2)

À plus fort grossissement, on devine le tissu hôte pénétrant entre les fibres des bandes rugueuses de la face rugueuse, voire plus en profondeur dans la prothèse avec une interface difficile à préciser entre matériau et tissu de recouvrement (figure 33). Ce tissu est riche en fibroblastes et en matrice extracellulaire.

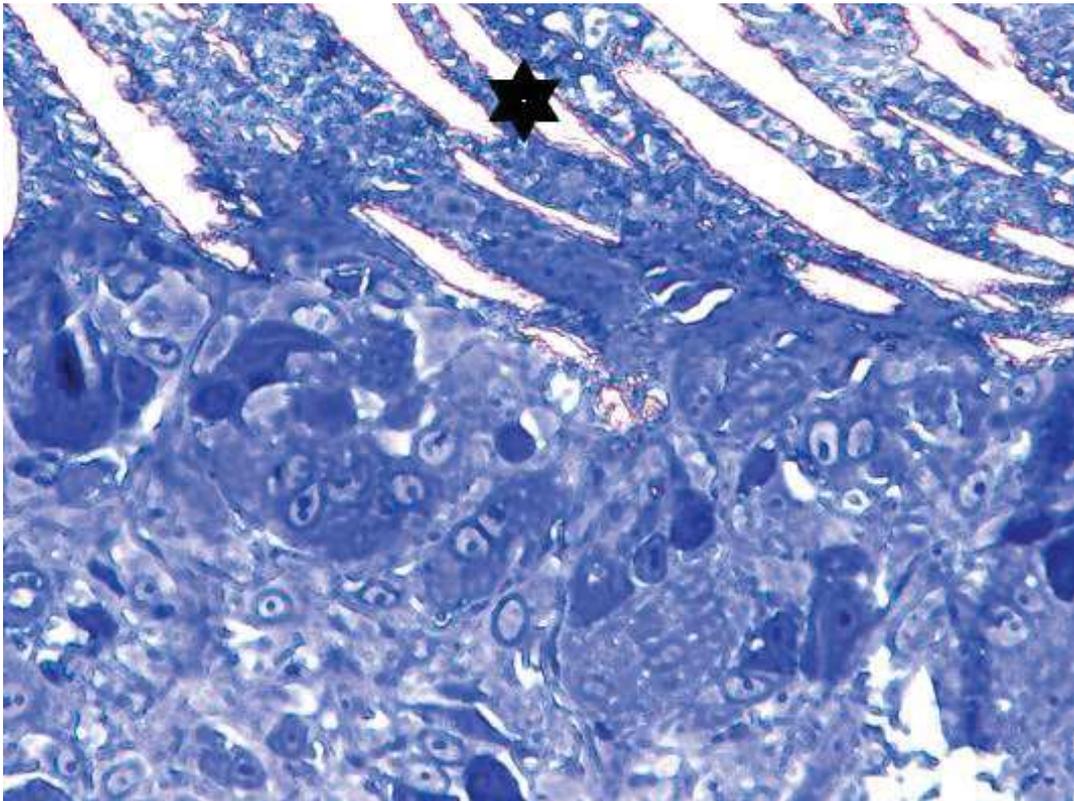
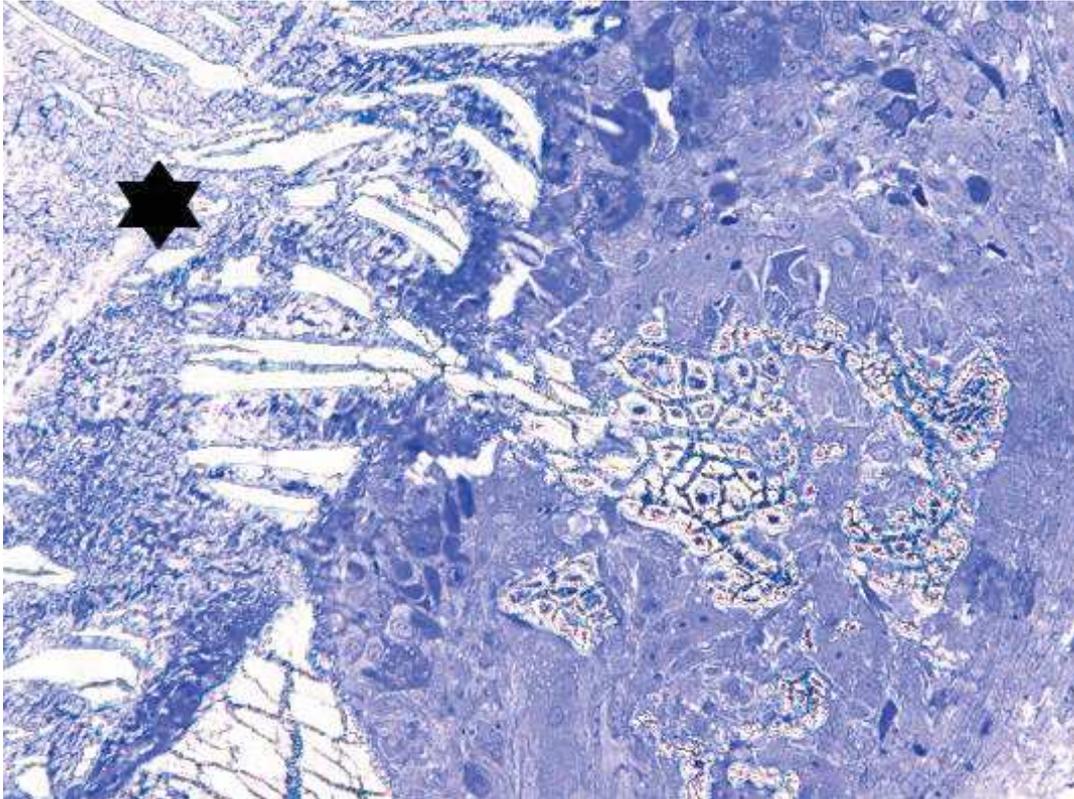


Figure 33 : microscopie optique (bleu de toluidine). Interface entre le tissu hôte recouvrant la prothèse et la face rugueuse de la prothèse ; x 20 en haut et x 40 en bas (étoile désignant la prothèse)

A l'inverse, sur la face lisse, le tissu est moins abondant, semble pouvoir se « détacher » de la prothèse et nous dessinons parfaitement l'interface entre prothèse et tissu hôte (figure 34).

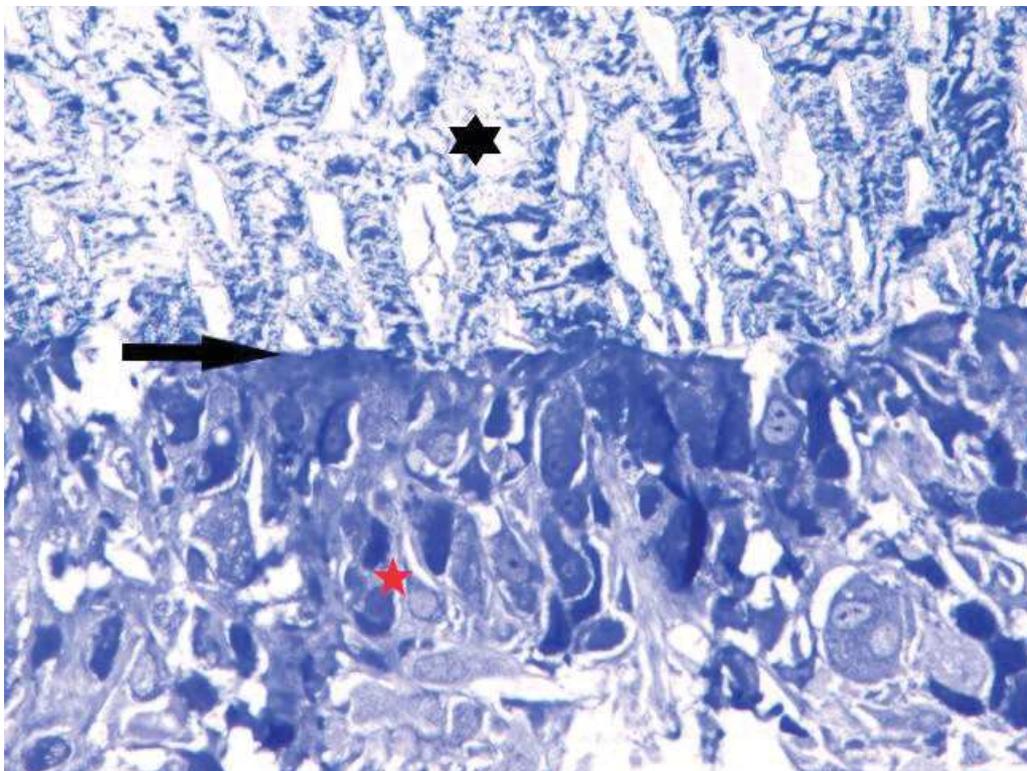
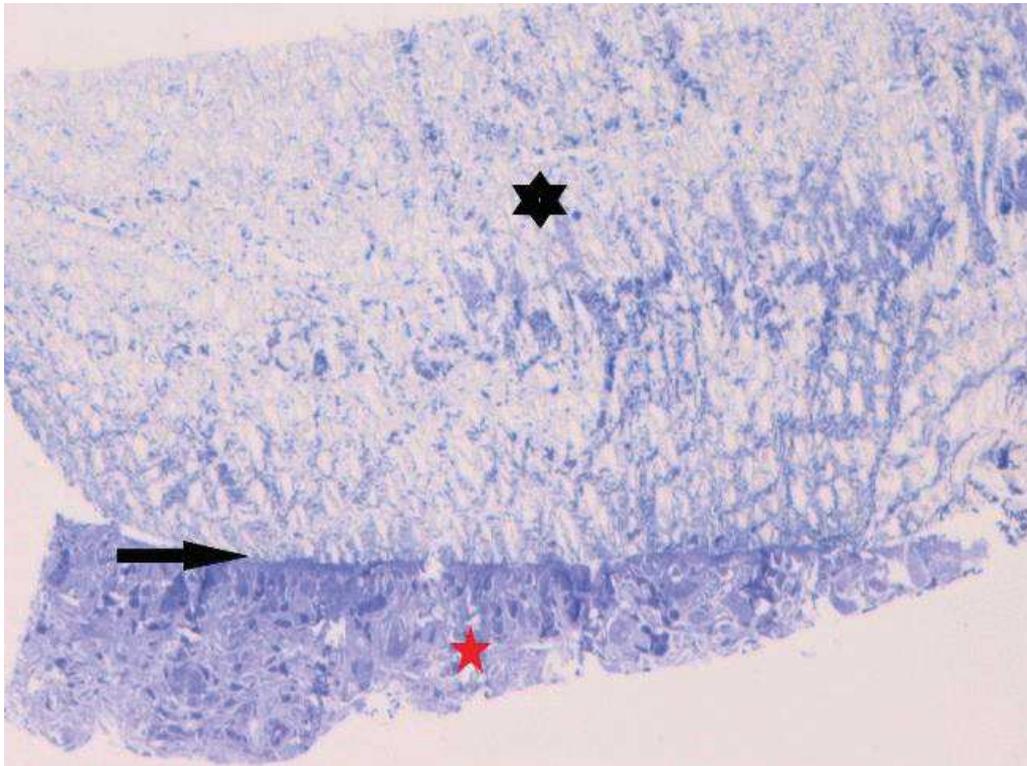


Figure 34 : microscopie optique (bleu de toluidine). Interface entre le tissu hôte recouvrant la prothèse et la face lisse de la prothèse ; x10 en haut et x40 en bas. Le tissu hôte semble pouvoir se « détacher » facilement et est comme posé à la surface de la prothèse avec une interface parfaitement identifiable (flèche) entre prothèse (étoile noire) et tissu hôte (étoile rouge)

## ii) Analyse au MEB

Les échantillons biologiques sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 4% et paraformaldéhyde 1% dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4). Après 2 rinçages de 10 minutes dans le même tampon, une post-fixation est réalisée au tétroxyde d'osmium 1% dans le même tampon cacodylate 0,1 M pendant une heure. Ces réactifs proviennent d'Euromedex (Souffelweyersheim, France). Les échantillons ainsi fixés sont ensuite déshydratés par des passages successifs pendant 10 minutes dans des bains d'éthanol puis par la technique de dessiccation par contournement du point critique dans un appareil à point critique (Balzers, Lichtenstein, Germany). Après refroidissement, le solvant de transfert (éthanol) est remplacé par du dioxyde de carbone liquide. Puis la température et la pression dans le récipient clos sont amenées à des valeurs supérieures au point critique du CO<sub>2</sub> : soit 31 °C et 7400 kPa, à partir desquelles la densité de la phase liquide est identique à celle de la phase gazeuse (trajet 1, marqué en bleu sur la Figure 35). Cette méthode permet d'éviter les tensions de surface existant au moment de la vaporisation du solvant et pouvant entraîner des déformations des structures des échantillons responsables d'artéfacts. À noter que le franchissement de la courbe de vaporisation peut aussi être évité en utilisant la méthode de lyophilisation (trajet 2, marqué en vert sur la Figure). Les échantillons ainsi déshydratés sont ensuite métallisés avec un alliage Au/Pd (Humer junior, Siemens, Karlsruhe, Germany) avant d'être analysés au microscope électronique.

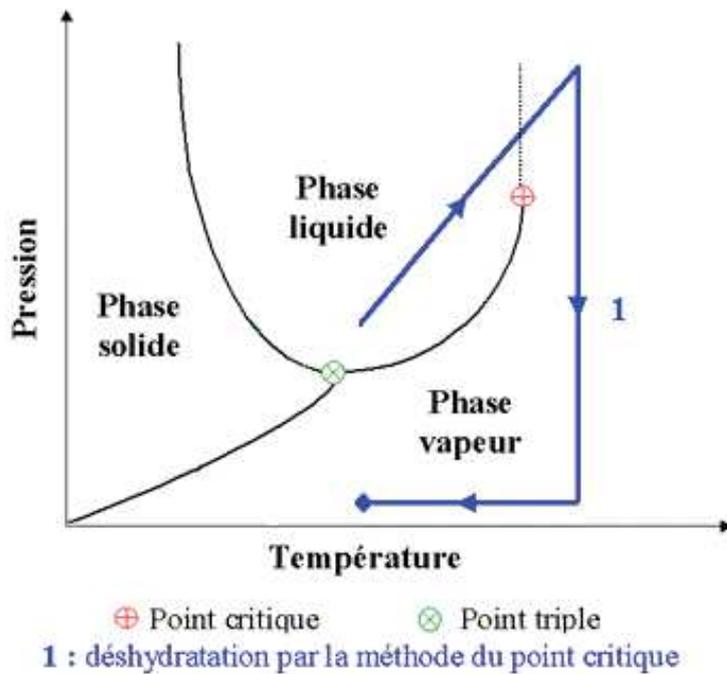


Figure 35 : principe de la dessiccation par contournement du point critique

Les analyses MEB ont été réalisées avec un microscope Quanta FEG-250 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). Ce microscope nous a également permis de réaliser des observations en mode environnemental (ESEM), c'est-à-dire sans déshydratation ni métallisation des spécimens.

Premièrement, nous avons pu confirmer l'importance de la réponse tissulaire sur la face rugueuse par rapport à la face lisse de la prothèse (figure 36), et ce, quel que soit la zone d'intérêt (centre, lâchage, sans lâchage comme décrit sur le plan d'analyse de prothèse).

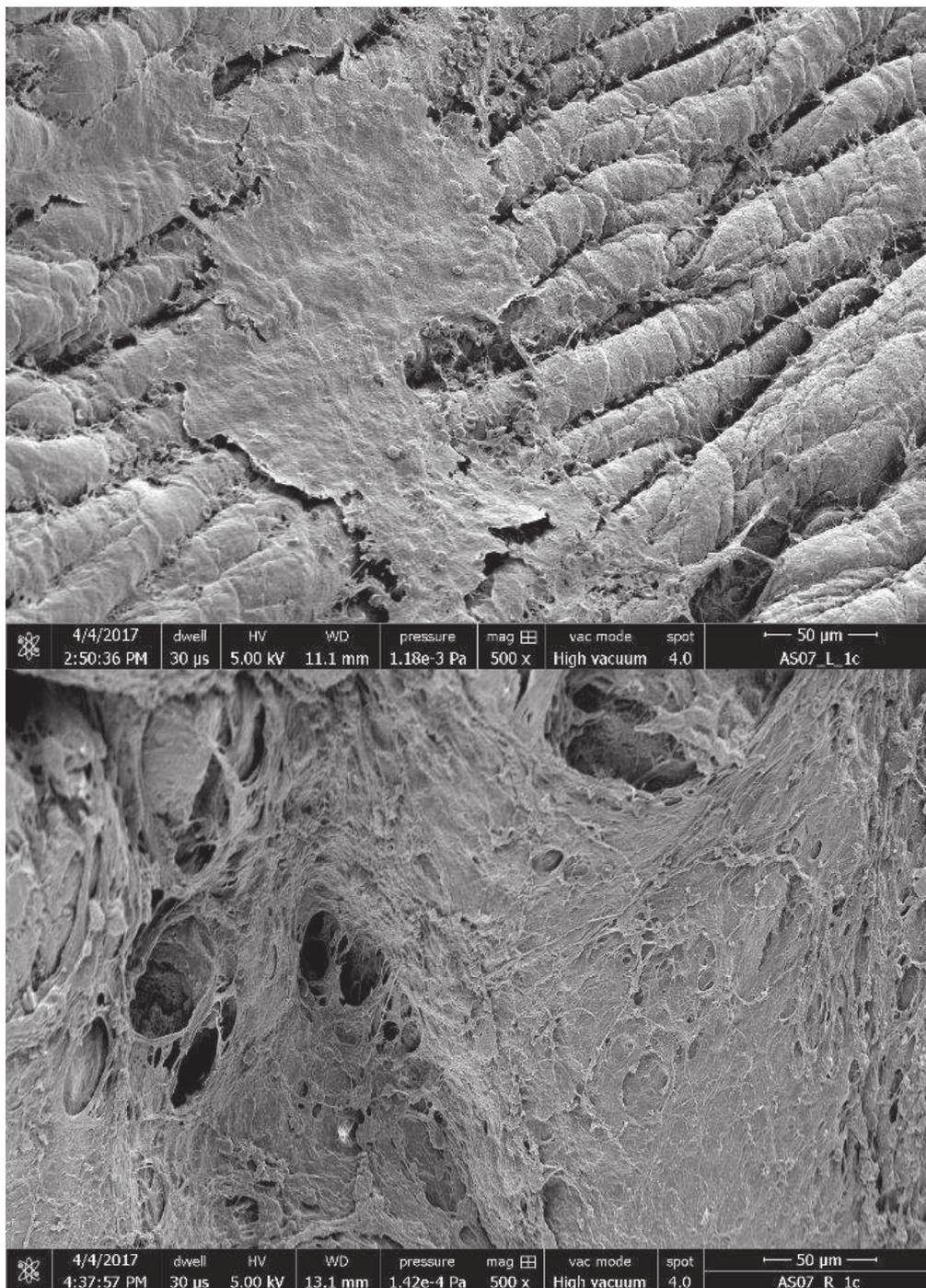


Figure 36 : micrographie en MEB. Recouvrement tissulaire de la prothèse au même grossissement (x 500). En haut : zone de lâchage face lisse (prothèse largement découverte). En bas : zone de lâchage face rugueuse (prothèse quasiment complètement recouverte)

Si l'on se concentre sur les analyses de la face lisse, voici les éléments que nous avons pu noter, illustrés systématiquement d'une photographie :

1. Le tissu hôte semble peu « adhérent » à la face lisse de la prothèse puisque nous constatons en MEB un décollement du tissu conjonctif, « en bloc », à proximité d'un orifice de passage d'une suture sans que l'on puisse conclure si cela est lié à la mobilisation manuelle de la prothèse lors de la reprise chirurgicale ou si cela peut être un phénomène antérieur (figure 37).

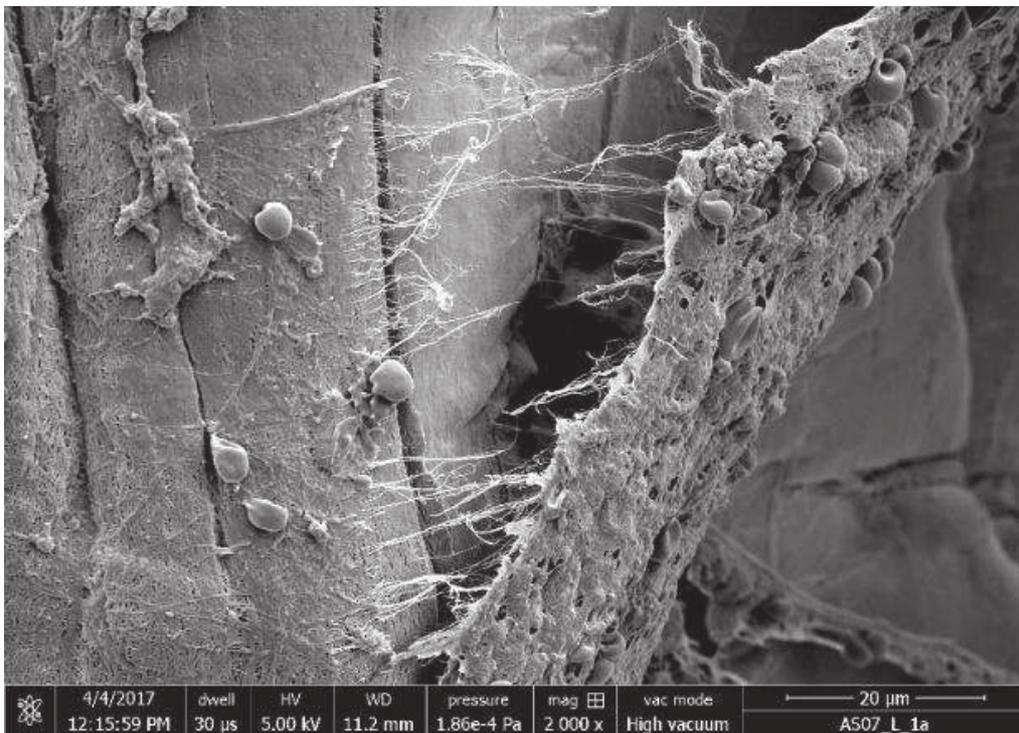


Figure 37 : micrographie en MEB. Décollement du tissu hôte de la face lisse de la prothèse à proximité d'un orifice de passage de point de suture ; x 2000

2. Nous retrouvons également des zones de rupture du tissu conjonctif néoformé témoignant peut-être des contraintes subies et de l'incapacité de ce tissu trop fin à « résister » à celles-ci (figure 38).

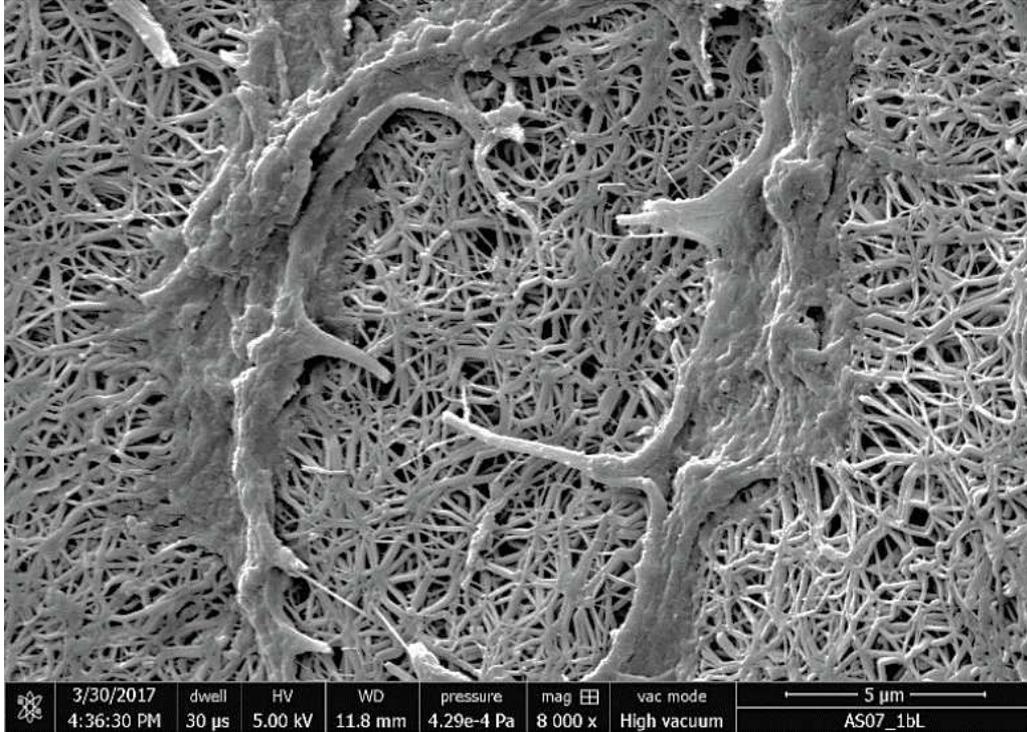


Figure 38 : micrographie en MEB. Rupture du tissu conjonctif néoformé à la surface de la face lisse ; x 8000

3. Nous retrouvons plus d'éléments cellulaires à proximité des orifices de passage des sutures témoignant probablement de la réaction de granulation que provoque la présence de fils non résorbables (corps étrangers) (figure 39).

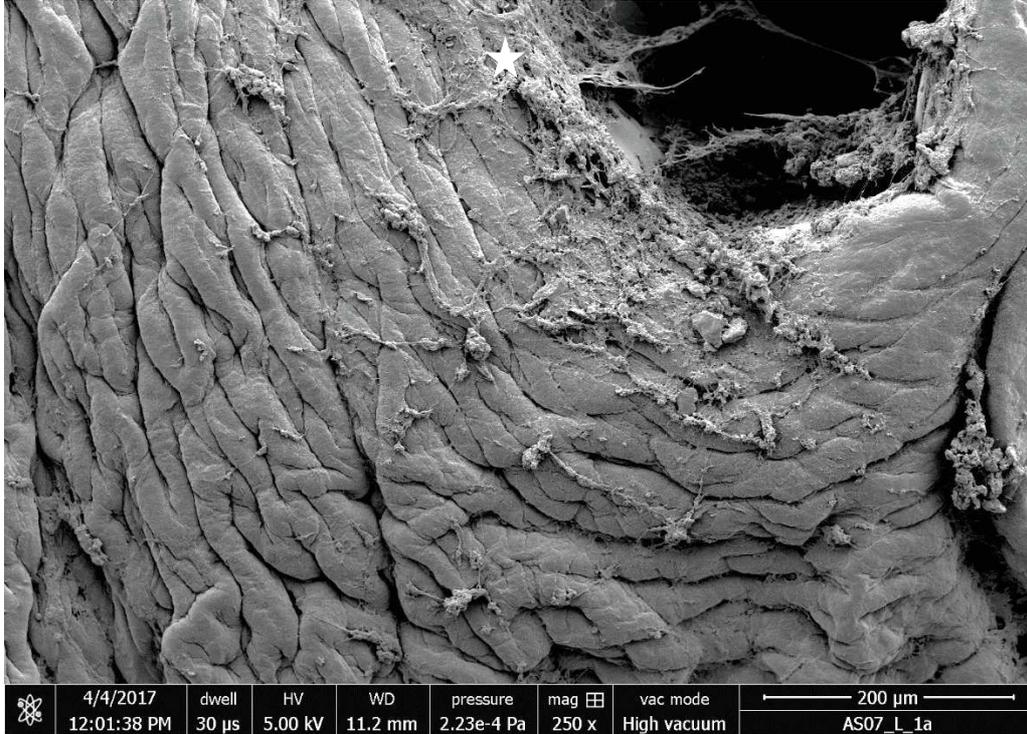


Figure 39 : micrographie en MEB. Présence de tissu de colonisation sur les sites de passage des sutures (étoile)

4. Enfin, le tissu néoformé (flèche rouge, figure 40) semble « ponter » les plis formés par la prothèse (flèche jaune, figure 40)

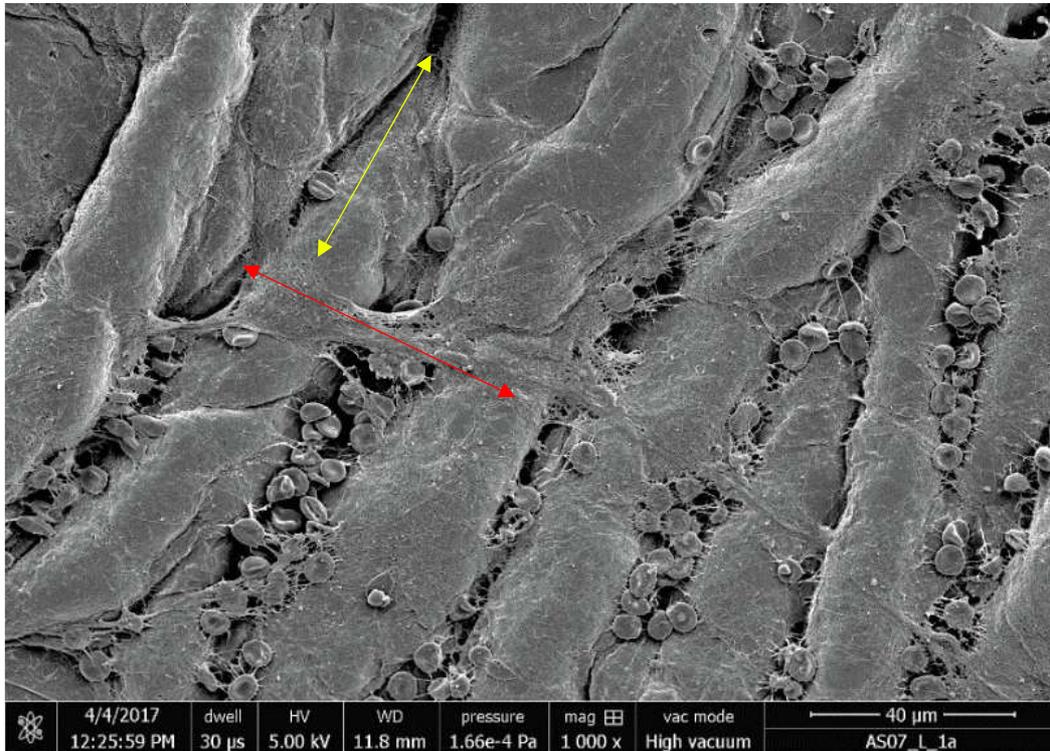


Figure 40 : micrographie en MEB. Le tissu néoformé (flèche rouge) à la surface de la prothèse semble « ponter » les plis que forme celle-ci (flèche jaune)

Les analyses ont ensuite porté préférentiellement sur la face rugueuse des prothèses afin d'analyser les différences en fonction des aires d'intérêt. L'analyse fine des différentes zones nous a conduit à plusieurs constats que nous illustrons à nouveau systématiquement de photographies :

1. le tissu hôte colonisant la prothèse est constitué d'une matrice plus épaisse, plus dense en zone sans lâchage comparativement à la zone centrale et surtout la zone avec lâchage. Le tissu collagène semble s'organiser en faisceaux de fibres collagènes entremêlées (figure 41).

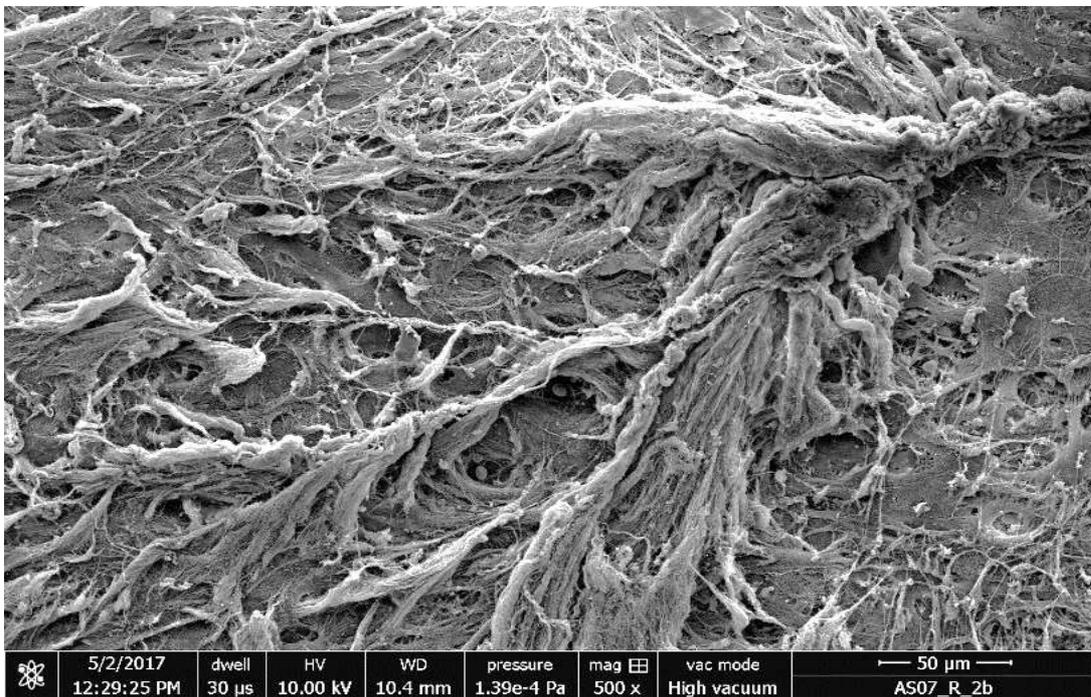


Figure 41 : micrographie en MEB. Tapis de matrice extra cellulaire formée à la surface de la prothèse et visualisation d'épais faisceaux de fibres collagènes entremêlées ; x 500

2. régulièrement, nous retrouvons un aspect « unidirectionnel » des fibres collagènes, que celles-ci soient organisées en faisceaux ou non, pouvant faire évoquer qu'elles s'orientent selon l'axe de plus grande contrainte comme « subissant » ou au contraire « luttant » contre les forces de traction (figure 42).

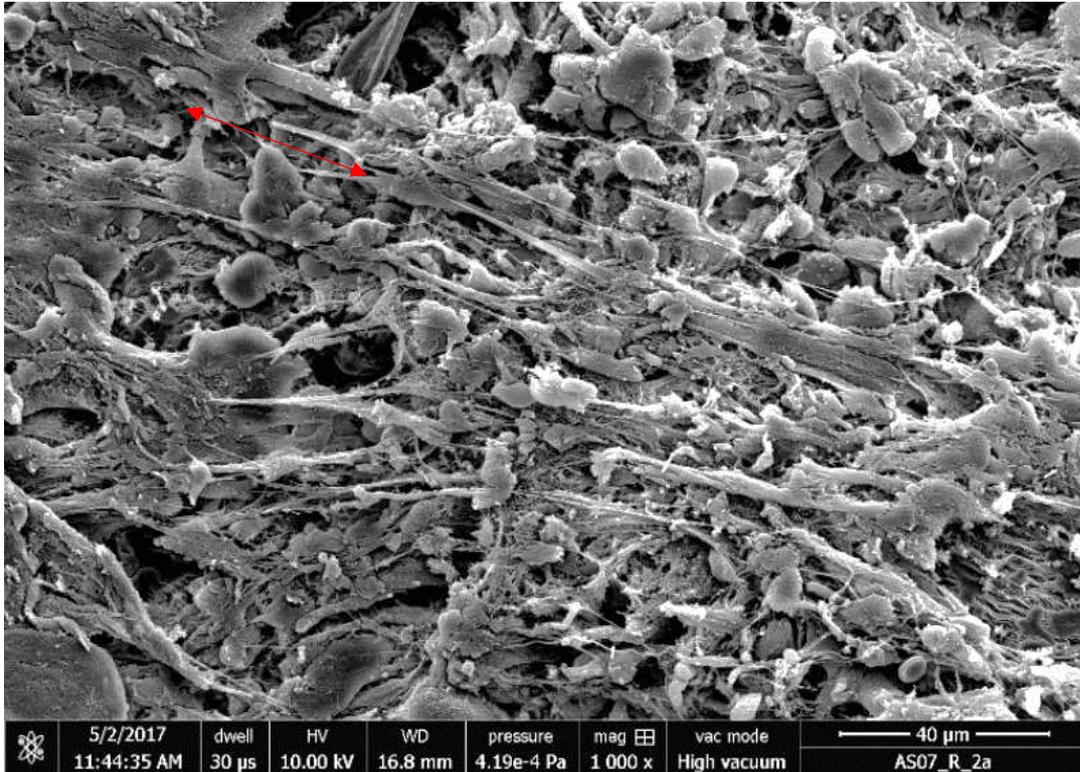


Figure 42 : micrographie en MEB. Faisceaux de fibres collagènes à la surface de la prothèse, semblant s'orienter parallèlement aux forces de traction exercées par les points de fixation (axe de la double flèche). X 1000

3. ce tissu néoformé semble s'organiser en couches successives, s'enrichissant peu à peu comme si la présence d'une première épaisseur de tissu à la surface de la prothèse facilitait la progression des suivantes (figure 43).

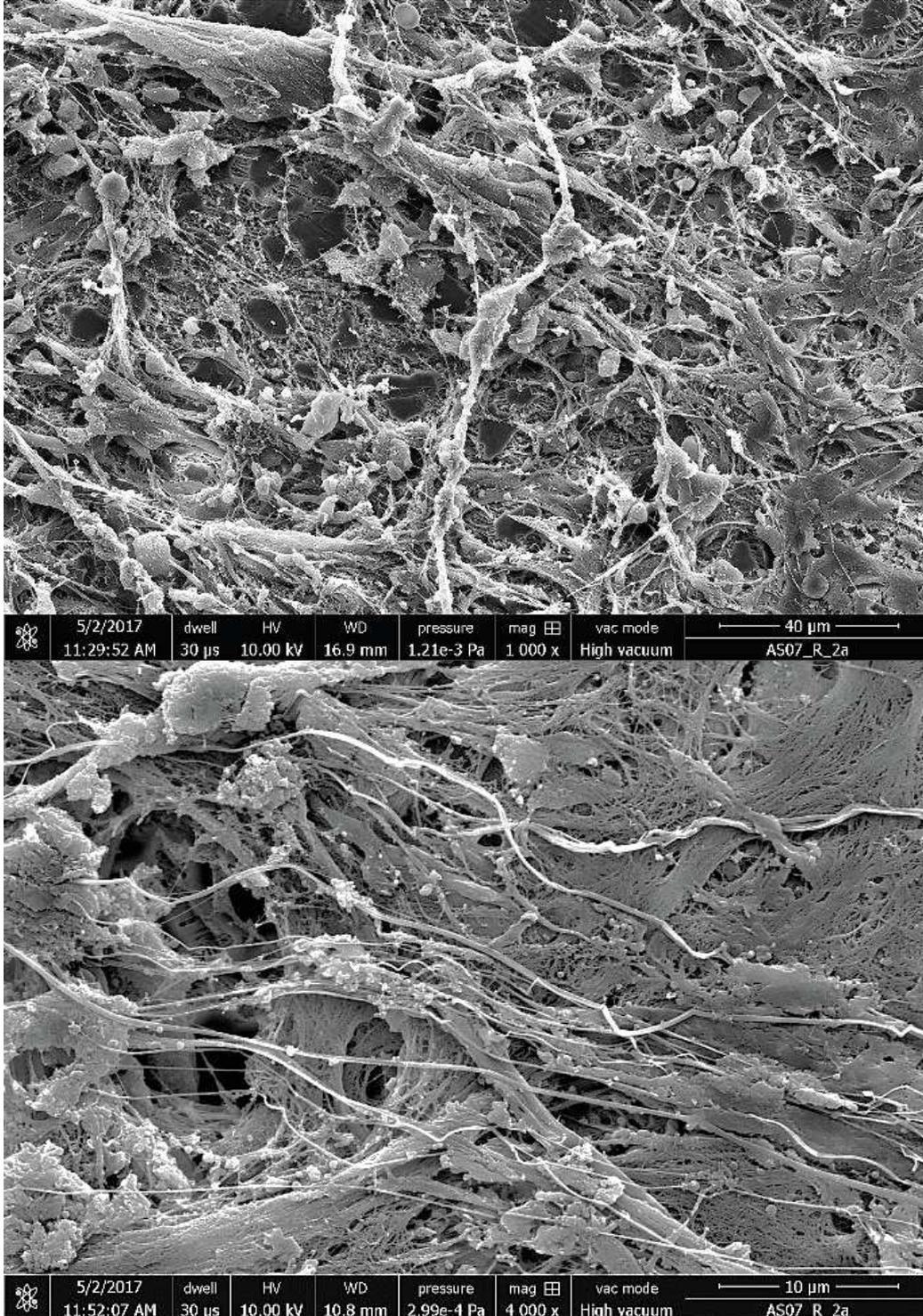


Figure 43 : micrographie en MEB. Visualisation de couches successives de matrice extracellulaire recouvrant la prothèse (x 1000 en haut et x 4000 en bas)

4. lorsque le tissu néoformé est peu dense, il semble « éviter » les nœuds des bandes lisses de la face rugueuse, les zones lisses (figure 44).

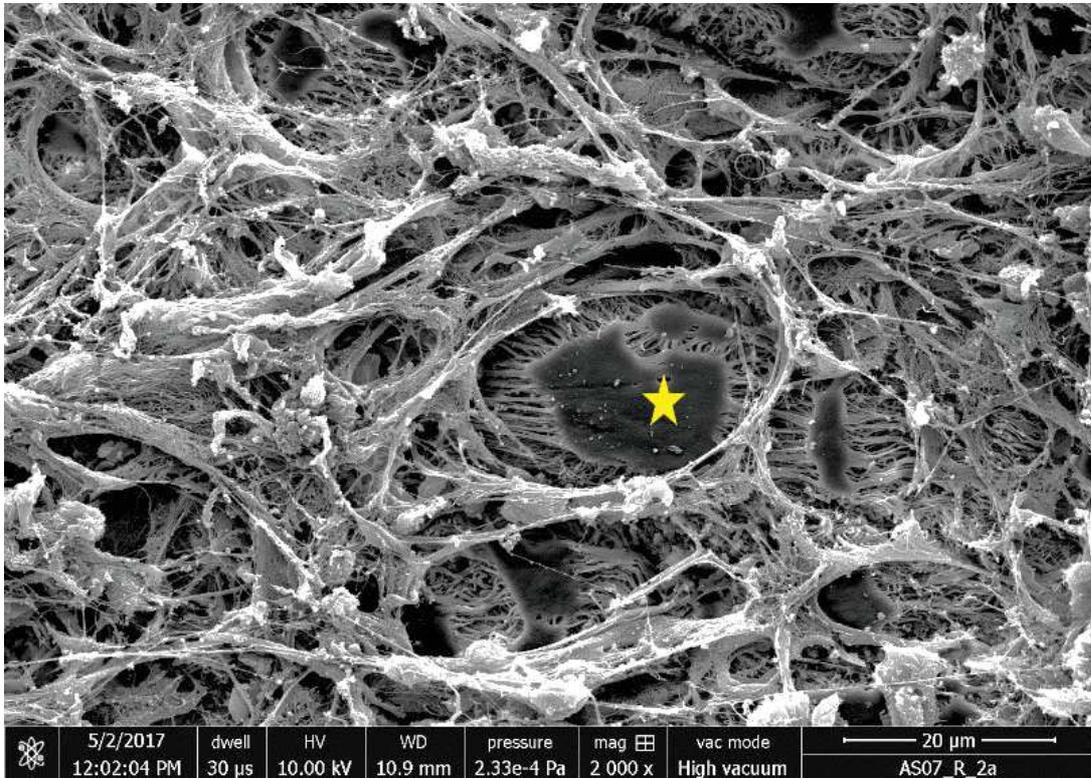


Figure 44 : micrographie en MEB. Aspect fin de la matrice extracellulaire formée dans la zone de lâchage avec aspect d'évitement des nœuds (étoile) du e-PTFE

### iii) Analyse au MET

Les échantillons biologiques sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 4 % et paraformaldéhyde 1 % dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4). Après 2 rinçages de 10 minutes dans le même tampon, une post-fixation est réalisée avec du tétraxide d'osmium 1 % dans un tampon cacodylate 0,1 M pendant 45 minutes. Les différents réactifs proviennent d'Euromedex (Souffelweyersheim, France). Les échantillons fixés sont ensuite déshydratés par des passages successifs pendant 10 minutes dans des solutions d'éthanol à concentrations croissantes.

Les échantillons fixés et déshydratés sont ensuite inclus dans la résine Spurr (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) qui a été choisie pour sa faible viscosité. La composition du Spurr a été adaptée spécifiquement à nos échantillons et est la suivante : 5,90 g de NSA (Nonenyl Succinic anhydride), 4,10 g de ERL4221 (cycloaliphatic epoxide resin), 1,59 g de DER 736 (Diglycidyl ether of polypropyleneglycol) et 0,1 g de DMAE (Dimethylaminoethanol) comme accélérateur. Les échantillons sont ainsi transférés successivement dans un mélange 1 volume de résine / 2 volumes d'éthanol absolu pendant 30 minutes, puis 1 volume de résine / 1 volume d'éthanol absolu pendant 1 heure et finalement dans 100 % de résine Spurr pendant 2 heures. Après un transfert à nouveau dans 100 % de résine pendant une nuit, les échantillons sont inclus dans de la résine fraîche et mis à polymériser à 60 °C pendant 48 heures.

La localisation des cellules est effectuée sur des coupes semi-fines réalisées avec un microtome automatique Reichert Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé d'un couteau en diamant. Afin de pouvoir réaliser l'ultramicrotomie, le biomatériau de e-PTFE est réduit au maximum, puis l'ensemble est ré-inclus dans la même résine Spurr que précédemment. Pour éliminer les éventuels plis, les coupes ultra-fines sont ensuite chauffées doucement en plaçant le couteau en diamant, contenant les coupes, sur une plaque chauffante (Lab-Line Instruments Inc., Ill, USA) à 45 °C, pendant 3 minutes. Finalement, les coupes ultra-fines sont collectées sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone, puis elles sont contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle 5 % (Euromedex, Souffelweyersheim, France) pendant 20 minutes et une solution de citrate de plomb pendant 10 minutes (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Les analyses MET sont réalisées avec un microscope Philips EM 208 (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) avec une tension d'accélération de 70 kV. Les images sont enregistrées sur des films Kodak SO163.

Il faut souligner que l'analyse en MET de nos explants relève du défi tant le e-PTFE ne se prête absolument pas à ce type de technique d'analyse du fait de sa grande porosité, de son caractère mou, « sans tenue » ce qui rend le travail d'inclusion et de coupe extrêmement délicat. L'expertise d'Eric Matthieu dans ce domaine a permis la richesse de ces résultats.

Ces analyses sur coupes transversales ont permis de montrer une véritable infiltration du tissu hôte néoformé dans la structure du e-PTFE sur la face rugueuse en zone centrale et sans lâchage (figure 45). Dans ces deux zones en effet, la matrice extracellulaire semble dense, s'infiltrant entre les éléments les plus superficiels de la prothèse. De même les éléments cellulaires semblent être en contact étroit avec le matériau. A l'inverse, à la surface de la zone de lâchage, le matériel semble peu abondant et non infiltrant.

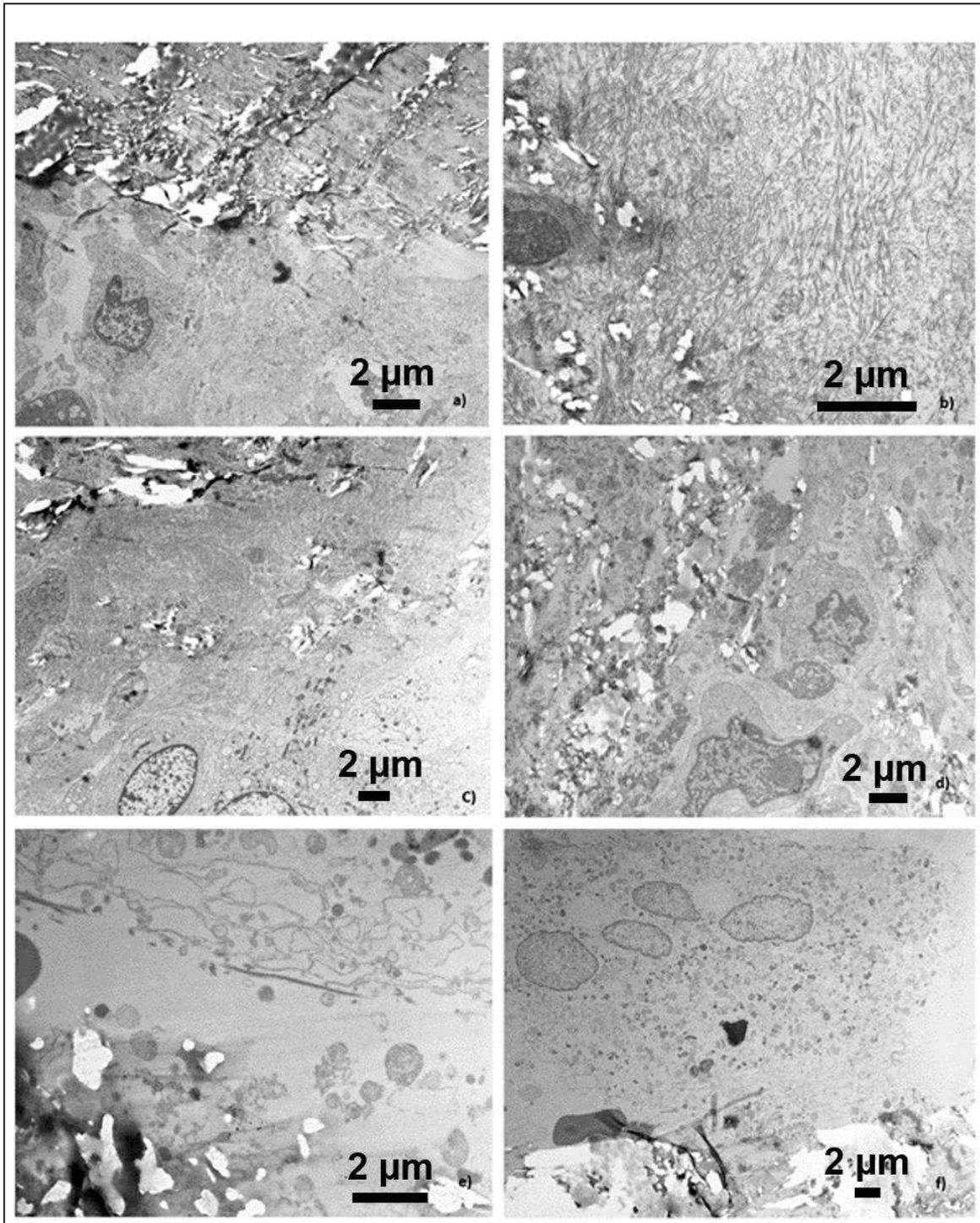


Figure 45 : micrographie en MET de l'explant en coupe transversale. Les images a) et b) correspondent à la zone sans lâchage ; les images c) et d) à la zone centrale de la prothèse ; et les images e) et f) à la zone de lâchage

#### iv) Analyse à l'AFM

Nous avons également observé une corrélation entre les observations de microscopie électronique (MEB, MET) et les propriétés mécaniques des revêtements biologiques recouvrant la surface de l'explant. La détermination des modules élastiques a été réalisée par la technique de nanoindentation en AFM. Le module de Young (E) du e-PTFE non implanté a également été mesuré afin de le comparer aux différentes zones A, B et C de l'explant n°1.

Ces mesures AFM révèlent d'importants changements du module d'élasticité des surfaces du biomatériau avant et après implantation (tableau 2).

	<b>Goretex® Dualmesh natif</b>	<b>Explant : zone centrale</b>	<b>Explant : zone sans lâchage</b>	<b>Explant : zone avec lâchage</b>
<b>Module de Young (en moyenne ± écart-type) (kPa)</b>	<b>295,0 ± 43,6</b>	<b>22,9 ± 1,9</b>	<b>27,7 ± 6,6</b>	<b>172,3 ± 11,2</b>

Tableau II : mesures des modules de Young du e-PTFE natif et de l'explant

Nous avons noté des différences de propriétés mécaniques des revêtements biologiques entre la zone avec lâchage (zone C) et les zones sans lâchage (zones A et B). À l'échelle microscopique, immédiatement après implantation, les cellules de l'hôte sont exposées à un substrat plutôt rigide ( $E = 295,0 \pm 43,6$  kPa), le Goretex® dualmesh vierge. Néanmoins il apparaît qu'avec le temps, après déposition des Matrices extracellulaires (MEC) dans les zones sans lâchage (zones A et B), les cellules de l'hôte reposent sur un substrat biologique beaucoup plus mou, avec un module de Young d'environ 25,0 kPa. La MEC néoformée

constitue donc un environnement qui est environ dix fois moins dur que celui que les cellules rencontrent initialement sur le goretex dualmesh vierge. Cette différence est statistiquement significative ( $p = 0,024$ ). De plus, le module de Young est très différent entre les zones A et B (environ 25,0 kPa) d'une part, et la zone C d'autre part. Ainsi, la zone C, correspondant à la périphérie avec lâchage de prothèse, est beaucoup plus dure ( $E = 172,3 \pm 11,2$  kPa), à l'échelle de la cellule, en comparaison avec les deux autres zones (A et B) ( $p = 0,002$ ).

#### **v) Synthèse des résultats**

Ainsi nous avons montré par nos observations en microscopie sur un explant humain, que le tissu hôte nouvellement formé non seulement recouvre préférentiellement la face rugueuse de la prothèse étudiée mais semble s'infiltrer au sein de cette structure poreuse et ce particulièrement dans les zones de la prothèse que l'on suppose être le moins soumise aux forces de pression.

Comme nous l'avons rappelé, peu d'études sont retrouvées dans la littérature sur l'analyse de l'intégration d'une prothèse en goretex sur son site d'implantation diaphragmatique. Kimber et al ont trouvé eux, une réaction inflammatoire importante et un décollement du tissu hôte à l'interface prothèse-diaphragme natif chez l'agneau (52). Il existait cependant un détachement, lors des coupes, des structures biologiques déposées et ils ont conclu que cette séparation du tissu environnemental de la prothèse pouvait être à l'origine de récurrences herniaires. Toutefois, avec la technique de double inclusion que nous avons mise au point et utilisée, il a été possible d'éviter les détachements généralement observés au niveau des interfaces et de montrer des interfaces intactes avec un contact étroit entre le e-PTFE et la réponse biologique de l'hôte. Plus encore, avec une même technique d'inclusion sur les deux faces de la prothèse, on note une bien meilleure intégration du tissu hôte sur la face rugueuse que sur la face lisse permettant ainsi de prouver le rôle de la différenciation de surface des prothèses

diaphragmatiques, permettant d'optimiser l'intégration sur le versant thoracique et, de limiter les phénomènes adhérents sur le versant abdominal.

Deuxième résultat intéressant, il existe globalement une organisation spécifique des fibres de collagène suivant un axe unidirectionnel en zone périphérique avec lâchage, potentiellement soumise aux plus grandes forces de traction, en comparaison avec la zone centrale A, où les fibres de collagène sont orientées de manière aléatoire.

Nous avons pu également montrer que le module de Young du e-PTFE natif est relativement élevé, définissant probablement une surface « dure » pour les cellules et limitant le phénomène de migration cellulaire, propriété compensée en partie par la porosité du matériau. Bien que les mesures d'AFM aient dû être menées sur des échantillons fixés, elles reflètent les changements de propriétés mécaniques, survenus à la surface du e-PTFE après implantation. Ces données sont pertinentes pour la compréhension du processus d'intégration tissulaire de l'implant, puisqu'il est communément reconnu que les propriétés mécaniques des substrats influencent la morphogénèse, la différenciation ou la prolifération cellulaire (57). Les mesures AFM obtenues sur le biomatériau vierge et sur les explants montrent que les cellules vont rencontrer des propriétés mécaniques différentes au moment de l'implantation par rapport à l'état des surfaces après un certain temps d'implantation. Initialement, elles vont être exposées à un substrat plutôt dur d'un point de vue cellulaire ( $295,0 \pm 43,6$  kPa). Avec le temps, le e-PTFE sera recouvert d'une MEC issue de la réponse de l'hôte. Ainsi, les cellules feront face à un substrat biologique beaucoup moins dur (environ 25,0 kPa). Il est important de souligner que la rigidité que les cellules rencontrent au contact de la mince couche de MEC dans la zone de lâchage C, est bien différente des deux autres zones mieux intégrées. Ces cellules vont rencontrer une surface biologique plus dure ( $172,3 \pm 11,2$  kPa) qui, inévitablement, influencera le comportement cellulaire local. On sait que l'adhésion cellulaire est un processus complexe au cours duquel les cellules sondent les propriétés mécaniques de leur support (58). Enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence la migration de cellules

musculaires à la surface de nos explants. Ceci pourrait être une hypothèse pour expliquer les récurrences herniaires malgré une colonisation existante mais non suffisante de la prothèse.

Nous avons pu montrer que, en condition expérimentale, le e-PTFE présentait une fragilisation de son ultrastructure dès 30 % d'étirement uniaxial, quel que soit l'axe des bandes rugueuses, avec un alignement des fibres dans l'axe de plus grande contrainte. Alors que macroscopiquement nous obtenons un étirement de 100 % sans rupture du matériau, son ultrastructure, elle, « souffre » des forces exercées et son architecture s'en trouve remaniée pouvant influencer sur le comportement du tissu hôte après son implantation.

### **c) Cahier des charges**

Ainsi ces différentes analyses nous permettent de définir le cahier des charges d'une prothèse optimale dans cette indication spécifique de la hernie diaphragmatique congénitale prise en charge en période néonatale par l'implantation d'une prothèse.

Le minimum requis pour une prothèse, décrit par Williams (59) est bien sûr la capacité à être en contact avec le tissu hôte humain sans entraîner une réaction à corps étranger trop importante. Mais nous savons maintenant que cela ne suffit pas dans notre indication et qu'en plus d'être biocompatible, une prothèse doit pouvoir promouvoir la colonisation tissulaire et présenter des caractéristiques biomécaniques particulières.

### **i) Données bibliographiques**

Les matériaux utilisés actuellement ne sont pas des prothèses développées spécifiquement pour cette indication mais pour le champ d'application large qu'est la réparation tissulaire ou

encore la couverture d'un défaut tissulaire. Cependant, la hernie diaphragmatique congénitale présente un challenge très spécifique, que nous pouvons retrouver dans d'autres situations mais toujours chez l'enfant : subir des forces de tractions fortes liées d'une part à la croissance de l'enfant et d'autre part aux mouvements ventilatoires, aux efforts d'hyperpressions brutaux que peuvent représenter les pleurs, les efforts de toux...

Et pour mieux comprendre les contraintes mécaniques que peut subir une prothèse, pour connaître les objectifs à atteindre d'une prothèse diaphragmatique optimale, le Dr Anne Schneider a étudié la croissance diaphragmatique entre la période nourrisson et adolescence en se basant sur l'analyse de mesure de surface du diaphragme sur des données scannographiques. Les résultats montrent que la surface d'une coupole diaphragmatique est multipliée par un facteur 4 à 5 et donc que la déformation uni-axiale peut-être extrapolée à environ 100 % (60).

Saade et al a développé un modèle biomécanique du diaphragme permettant de modéliser les mouvements respiratoires de celui-ci (61). A partir d'images scannographiques en inspiration et en expiration, ils ont pu reconstruire la cinétique diaphragmatique et la simuler avec une bonne fiabilité de leur modèle par rapport aux données expérimentales (figure 46).

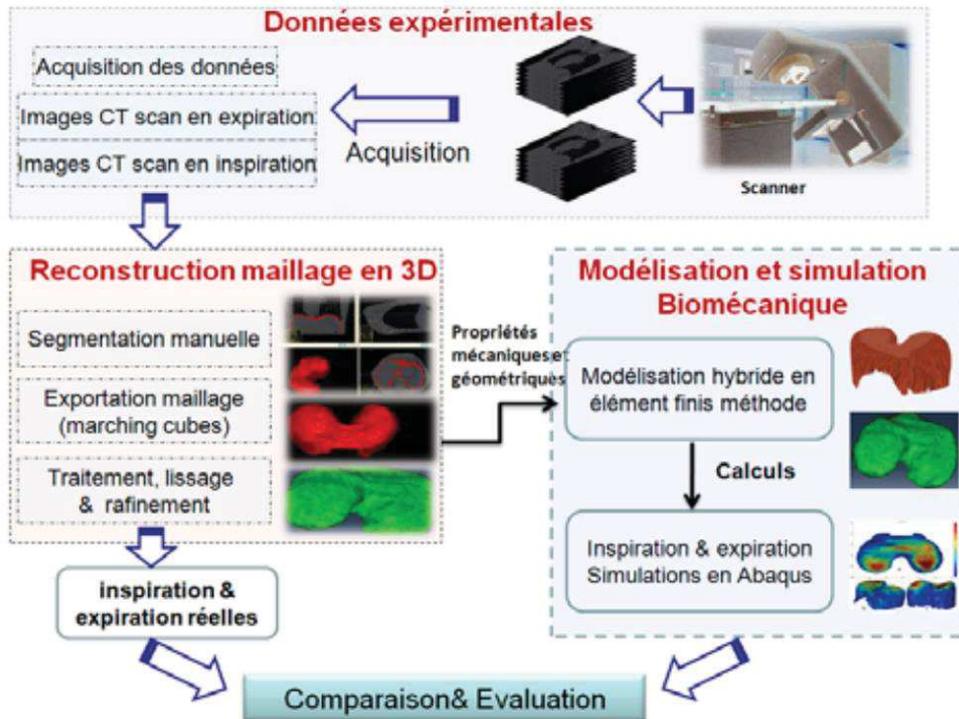


Figure 46 : méthode de modélisation de la dynamique diaphragmatique ; tiré de Modelisation biomecanique du diaphragme humain : du CT-4D au modèle du mouvement, Saade et al.

Ils ont pu constater que les parties périphériques du diaphragme ne présentent pas un mouvement ample aux environs des côtes laissant supposer que la rigidité des côtes peut contraindre le diaphragme à ne pas bouger vers l'extérieur.

Ces données sur les fortes contraintes mécaniques subies par le diaphragme en regard des côtes est corroboré par 3 éléments :

- Lors des réinterventions pour récurrence herniaire, il est noté que les prothèses se détachent du tissu hôte habituellement en région postérointerne, c'est à dire en regard de leurs attaches costovertebrales (62).
- Le pic de fréquence de récurrence herniaire survient vers 18 mois surtout en cas d'agénésie diaphragmatique, où il n'existe pas d'attache musculaire pour la fixation de prothèse (63).

- Les déformations rachidiennes de type scoliose, que l'on retrouve dans 12% des cas de hernies diaphragmatiques congénitales réparées avec prothèse, sont un facteur de risque de récurrence (64).

Enfin, une étude réalisée par Fauza et al analyse et compare le comportement mécanique des portions tendineuses de diaphragmes de cadavres de nouveau-nés et d'adolescents par des tests de traction uniaxiale (65). Selon ce travail, la contrainte maximale est plus élevée dans le groupe adolescents ( $3,8 \pm 2,6$  vs  $1,6 \pm 0,7$  MPa) et un module d'élasticité également plus élevé dans ce groupe ( $29,2 \pm 24,2$  vs  $9,0 \pm 5,9$  MPa). Cependant, ces résultats sont à interpréter avec prudence, d'une part du fait du nombre limité de cas étudiés ( $n = 13$ ), d'autre part, il s'agit d'échantillons prélevés, congelés à  $-80$  °C testés en statique alors que le diaphragme est une structure tridimensionnelle, élastique et compressible.

Par ailleurs, concernant les caractéristiques biologiques de la prothèse, on a pu voir que de nombreuses prothèses existent, de nombreux travaux portent sur l'optimisation de ces biomatériaux (cf chapitre sur l'état des lieux sur les prothèses).

## ii) Les conclusions principales de nos analyses

Nos analyses sur le e-PTFE nous ont permis d'affirmer plusieurs éléments.

### Concernant sa structure :

- C'est un matériau fortement hydrophobe,
- Le e-PTFE est un matériau poreux mais dont les pores sont étroits et ce, même sur la face rugueuse,
- Il est classé dans les biomatériaux rigides du fait d'un module de Young relativement élevé aux alentours de 295 MPa,
- En test de traction uniaxiale, il présente un comportement élastique avec une déformation proche de 100 %, puis plastique
- Lors de ces tests de traction, l'orientation des bandes sur son versant rugueux n'influence pas sa résistance mécanique
- Enfin, en test sous MEB, nous observons des fissures de son ultrasstructure dès 10 % d'étirement avec un alignement progressif des fibres

### Concernant la réponse de l'hôte à son implantation en site diaphragmatique :

- Le dépôt tissulaire est plus abondant sur le versant rugueux que lisse avec des zones de rupture de la matrice extracellulaire formée sur le versant lisse en zone de lâchage.
- Le tissu conjonctif présente une orientation évidente avec un alignement des trames collagènes dans le sens de plus forte traction probablement.
- Sur le versant rugueux, la densité de tissu de colonisation est nettement plus importante dans les zones centrales et sans lâchage de la prothèse par rapport à la zone de lâchage avec une impression de « superposition » des couches de tissu conjonctif.
- En coupe, le tissu conjonctif néoformé semble infiltrer la prothèse.

- Le module de Young de l'explant est nettement modifié par la présence de tissu conjonctif avec un module situé entre 22 et 27 kPa en zone centrale et sans lâchage contre 172 kPa en zone de lâchage et on le rappelle, 295 kPa pour du e-PTFE vierge non implanté.

### **iii) Attentes d'une prothèse optimale**

Ces éléments confrontés aux données de la littérature et à l'état de l'art en matière de prothèses pariétales et plus précisément de prothèses diaphragmatiques nous a permis de définir le cahier des charges de la prothèse optimale pour prise en charge d'une hernie diaphragmatique congénitale à large défaut chez le nouveau-né.

Cette prothèse optimale doit donc être :

- A minima biocompatible voir promotrice de la colonisation par le tissu hôte,
- Résistante à la traction au-delà de 100 % d'étirabilité
- Tout en restant souple, ces 2 paramètres pour absorber les contraintes mécaniques liées à la croissance de l'enfant et aux mouvements respiratoires et ce particulièrement sur ces points d'attaches postérointernes.
- Biface afin de différencier les réactions tissulaires sur le versant thoracique et abdominal dans l'idée d'optimiser son intégration rapide sur le versant thoracique tout en limitant les phénomènes d'adhérences sur le versant abdominal.
- Hydrophile

### **3) LES DEUX AXES DU TRAVAIL DE THESE**

La définition de ce cahier des charges nous a conduit à développer deux axes de recherche : l'un basé sur l'utilisation du e-PTFE, l'autre sur le développement d'un nouveau biomatériau innovant. D'après nos analyses, le e-PTFE n'est certes pas le matériau optimal mais nous pouvons envisager d'améliorer son intégration par des techniques de fonctionnalisation. Cet axe permet d'améliorer le comportement biologique du e-PTFE mais ne modifie pas ses caractéristiques mécaniques et nous avons fait le choix de travailler également à la mise au point d'un matériau reprenant les données de notre cahier des charges.

Les recherches sur la fonctionnalisation du e-PTFE n'étant pas soumises à une clause de confidentialité, ils font l'objet de 2 publications acceptées et 2 soumises.

Celles sur le développement d'un nouveau biomatériau, ont quant à elles suscité durant de nombreux mois des démarches de dépôt de brevet. Malheureusement nous avons essuyé de nombreux écueils et consacré beaucoup d'énergie dans cette entreprise sans résultat aujourd'hui. Cependant la présentation de mes travaux aux journées de la Filière Maladie Rare Thoracoabdominale (FIMATHO) en 2018 a non seulement permis de recevoir un soutien financier de cette filière, mais a également vivement intéressé les représentants de la Fondation Maladie Rare (FMR) qui croit en notre projet et nous aide actuellement à avancer à nouveau sur cet axe et à susciter l'intérêt d'industriels. Dans ce sens, nous avons décidé de protéger nos travaux actuels et de ne pas publier pour l'instant nos résultats.

#### **4) FONCTIONNALISATION du e-PTFE**

##### **a) Procédés de fonctionnalisation chimique avec la polydopamine (PDA)**

###### **i) Rappels sur les propriétés de la PDA**

Le revêtement de matériau inspiré des propriétés de la moule est apparu comme une voie de recherche prometteuse afin de recouvrir toute surface d'une pellicule adhésive afin d'y greffer secondairement des molécules bioactives (66, 67). En effet certaines protéines secrétées par les moules sont riches en domaine 3,4-dihydroxy-DL-phenylalanine (DOPA) contenant des groupements cathecol et L-lysine, responsables d'un fort pouvoir d'adhésion en milieu humide comme en milieu sec (68). Dans une solution à pH 8,5, la dopamine s'oxyde spontanément pour donner une substance insoluble de couleur brun noir. La substance oxydante est l'oxygène dissous dans l'eau. Cette substance est un analogue structural de l'eumélanine, le colorant brun noir de la peau, qui y joue un rôle photoprotecteur. Mais lors de l'oxydation de la dopamine la substance obtenue recouvre la paroi du récipient réactionnel pour y constituer un film de PDA. La PDA peut aussi recouvrir la surface de tous les matériaux organiques et inorganiques (métaux, plastiques, verres...). Dreyer et al ont ainsi pu faire varier les propriétés du film déposé à la surface de substrat en modifiant la durée d'immersion, la concentration en DOPA, la température ou encore le pH de la (69). Les films de PDA sont hydrophiles et présentent un angle de contact statique pour l'eau compris entre 40° et 50° de façon indépendante du substrat utilisé.

Sur le plan moléculaire, la formation de PDA est actuellement encore mal connue du fait des multiples réactions qui entrent en jeu : après oxydation de la dopamine et formation de

dopamine quinone, il y aura cyclisation intramoléculaire et formation de 5-6 dihydroxyindole qui va polymériser ou former des agrégats supramoléculaires. Le 5-6 dihydroxyindole peut réagir avec lui-même par couplage aryl-aryl pour donner des oligomères, tétramères, etc... De nombreux isomères des différents oligomères ont une stabilité thermodynamique très proche et donc des probabilités de formation très voisines. Cela conduit à un mélange hétérogène de produits qui tous ensemble forment la PDA, qui n'est donc pas une substance bien définie. De plus la nature du tampon utilisé (pour obtenir un pH de 8,5) et de l'oxydant utilisé à la place de l'oxygène dissous dans l'eau vont modifier la vitesse de formation et la structure de la PDA obtenue (70). Il n'y a donc pas une PDA, mais des PDA dont la structure et les propriétés dépendent fortement des conditions réactionnelles utilisées.

Enfin, la PDA est biocompatible car sa structure est proche de la mélanine (71) qui est un pigment biologique très présent chez l'homme dans les cheveux, la peau et les yeux, sous la forme d'eumélanine et de phéomélanine (72). La PDA apparaît donc être un candidat intéressant pour la fonctionnalisation de biomatériaux inertes, comme le e-PTFE.

## **ii) Deux méthodes de fonctionnalisation du e-PTFE par la PDA**

### **(1) Imprégnation avec la PDA du e-PTFE**

Le chlorhydrate de dopamine (Sigma-Aldrich) à une concentration de 2 mg/mL (10,6 mM) est dissous dans un tampon TRIS 50 mM (tris hydroxyméthyl aminométhane) (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cette réaction se fait sous un flux continu d'oxygène apporté par une agitation mécanique (figure 47), à un pH alcalin (pH = 8,0 - 8,5). La dopamine est oxydée par l'oxygène de l'air présent dans la solution sous l'effet de l'agitation de la solution et s'auto-polymérise. Il y aura ainsi formation de minuscules agrégats de PDA qui vont se fixer sur toutes les surfaces au contact du mélange et a fortiori sur un substrat immergé dans la solution (figure 48). Nous assistons alors à la formation d'un dépôt sous la forme d'un film de PDA dont

l'épaisseur va croître avec le temps d'immersion jusqu'à atteindre une valeur stationnaire. Le dépôt progressif de PDA sur le substrat se manifeste par une coloration brune du substrat (figure 49).



Figure 47 : illustration de l'imprégnation des membranes de e-PTFE en solution

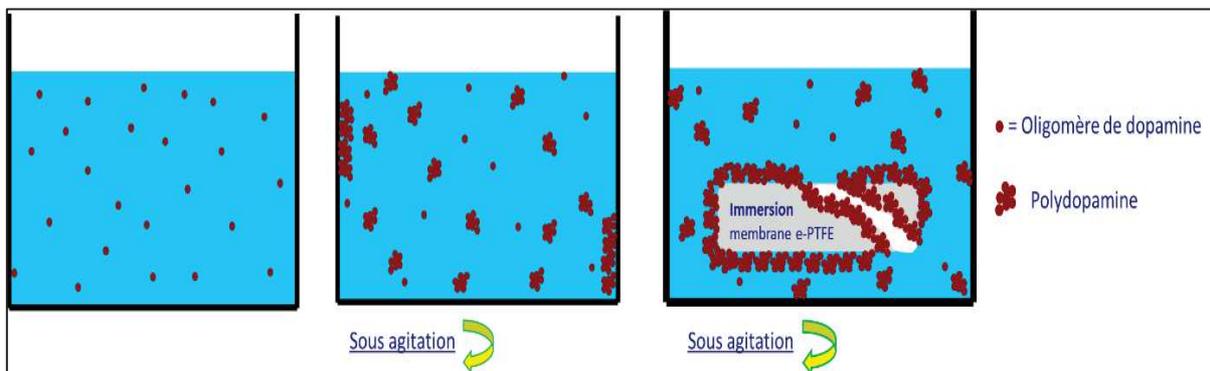


Figure 48 : formation d'agrégats et de films de PDA à la surface du e-PTFE immergé dans une solution de dopamine (pH 8,5) sous agitation mécanique continue. D'après thèse A. Schneider



Figure 49 : aspect du Goretex® imprégné en fin d'immersion

## (2) Dépôt d'un film de PDA sur du e-PTFE

Si l'on utilise la même solution de dopamine que celle décrite précédemment, mais que l'on supprime l'agitation mécanique de la solution, l'oxydation de la dopamine se produira essentiellement à l'interface air/eau et il se formera un film de PDA à la surface du liquide. Du fait de l'évaporation de l'eau au cours de la réaction et aussi à cause de la fixation de ce film PDA aux parois du bécher, il existe des forces de cisaillement qui vont entraîner la formation de fissures au sein de ce film qui risquent de le fragiliser lorsque les temps de réaction augmentent.

Le film de PDA est ensuite transféré à la surface du substrat à fonctionnaliser en utilisant la technique de Langmuir-Schaeffer (73) (figure 50). Dans notre étude, elle consiste à approcher le substrat de l'interface air/liquide à une vitesse constante de 0,01 cm/s. Le substrat est maintenu bien à l'horizontale afin que le dépôt ne se fasse que sur une seule des deux faces et le temps de contact avec l'interface air/liquide est d'une minute. Le film PDA va ainsi se détacher et coller à la surface du substrat à fonctionnaliser. La vitesse de retrait est de 0,02 cm/s. Le transfert est possible sur différents types de substrats.

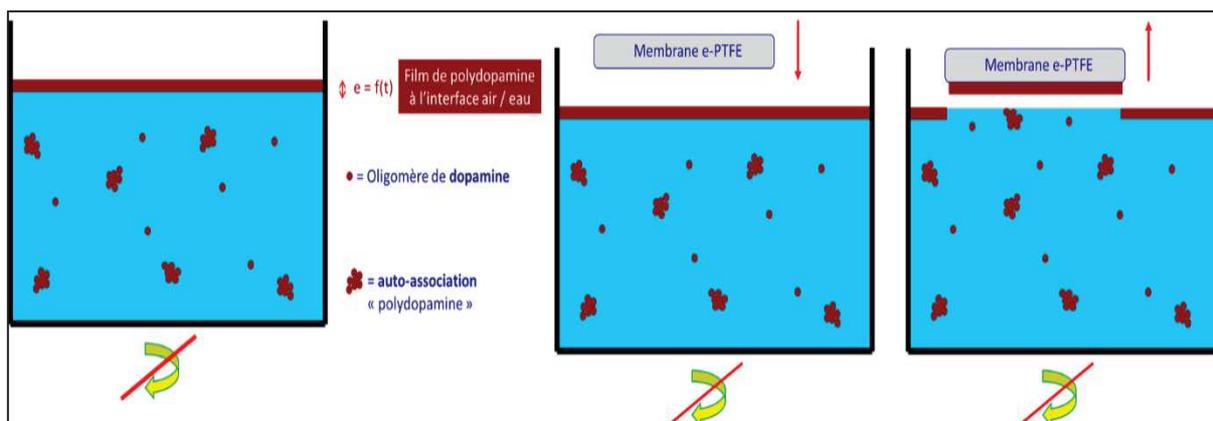


Figure 50 : formation d'un film de PDA à l'interface air/eau et son transfert à la surface d'un substrat (e-PTFE par exemple) par la technique de Langmuir-Schaeffer

Ces 2 techniques de fonctionnalisation à la polydopamine ainsi que l'analyse du dépôt formé font l'objet d'une publication dans « The Journal of Physical Chemistry Letters » (56) et sont parfaitement décrites dans le travail de thèse du Dr Anne Schneider.

### iii) Analyses du e-PTFE fonctionnalisé par la polydopamine

#### (1) Mesures d'angle de contact

Nous avons comparé les mesures d'angle de contact du e-PTFE vierge, du e-PTFE imprégné de PDA (e-PTFE\_i) et du e-PTFE avec film de PDA (e-PTFE\_f), selon la même technique que précédemment décrite (figure 51). Il s'est avéré que le revêtement par la polydopamine est tout aussi efficace sous forme de film ou d'imprégnation en terme d'hydrophilie, puisque l'on obtient une augmentation de l'hydrophilie du e-PTFE dans les deux cas.

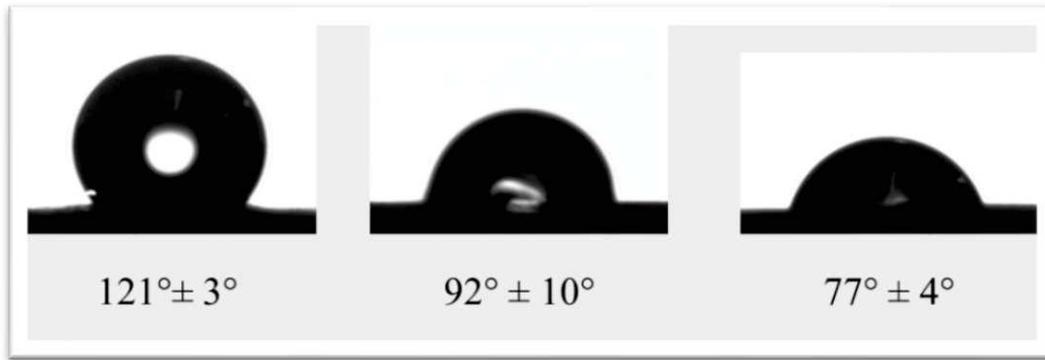


Figure 51 : angles de contact statiques mesurés pour le e-PTFE vierge, le e-PTFE\_i et e-PTFE\_f

## (2) Analyses en microscopie : MO, SEM, MET et AFM

Ces analyses font l'objet d'un article publié dans *Material Sciences and Application* (74).

En MEB, nous avons observé des caractéristiques de surface bien différentes entre le e-PTFE vierge, le e-PTFE\_i et le e-PTFE\_f.

Le biomatériau vierge montre la structure fibrillaire caractéristique du produit que nous avons déjà décrite précédemment. Le e-PTFE\_i garde cette structure fibrillaire avec cependant un épaissement des fibrilles qui sont enrobées par la PDA. Au contraire, le e-PTFE\_f possède une surface plutôt plane qui correspond au film de PDA transféré, émaillé de fissures qui laissent entrevoir les fibrilles du e-PTFE sous-jacent (figure 52). À des plus forts grossissements, il apparaît que le film de PDA (e-PTFE\_f) est de nature granulaire (figure 53). À la surface des échantillons fonctionnalisés, nous notons également la présence d'agrégats de PDA.

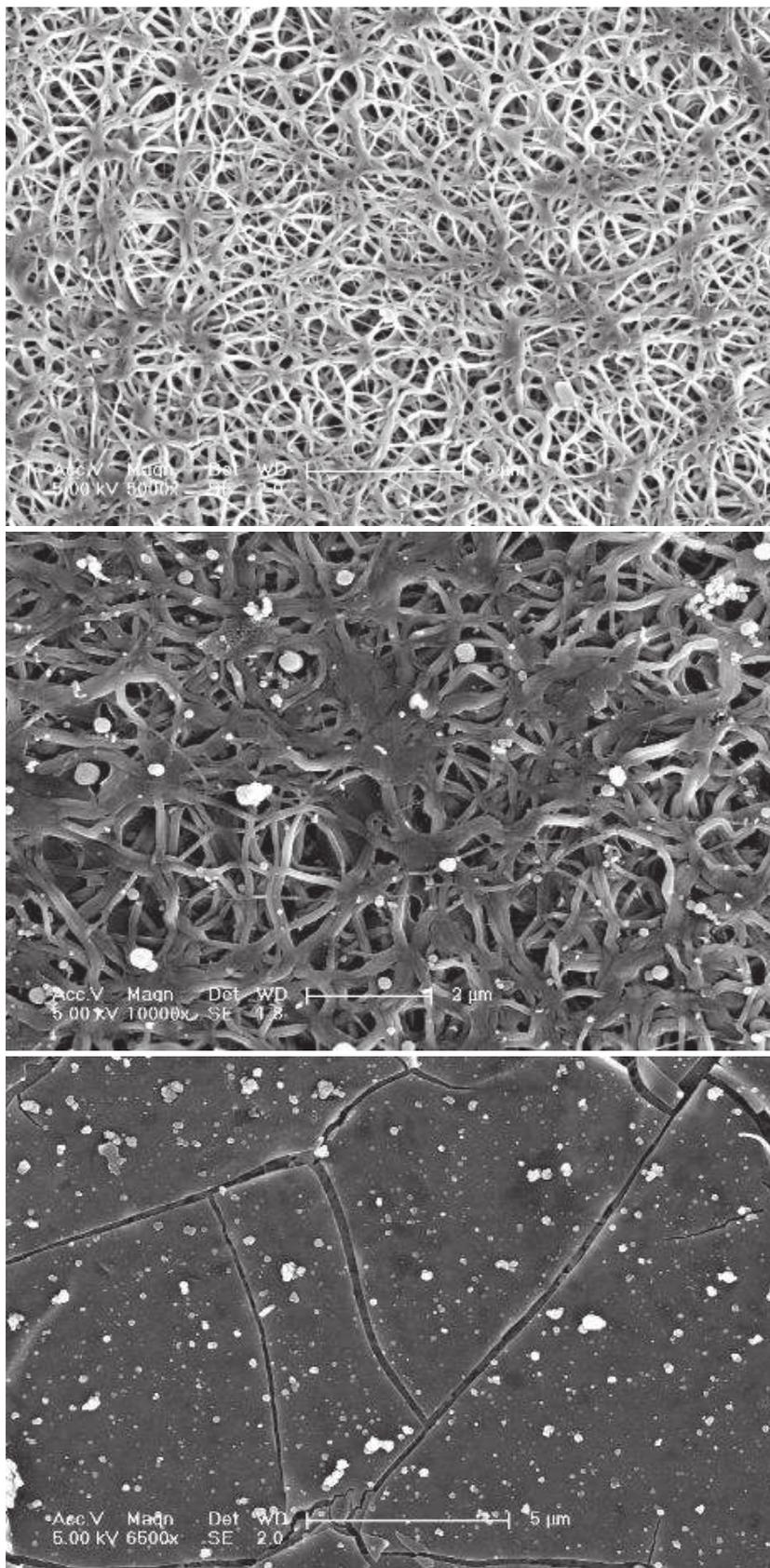


Figure 52 : micrographie en MEB. Aspect des surfaces de e-PTFE (en haut), e-PTFE\_i (milieu) et e-PTFE\_f (en bas) en MEB. Les fissures dans le film de PDA transféré laissent entrevoir la structure poreuse du e-PTFE sous-jacent. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA

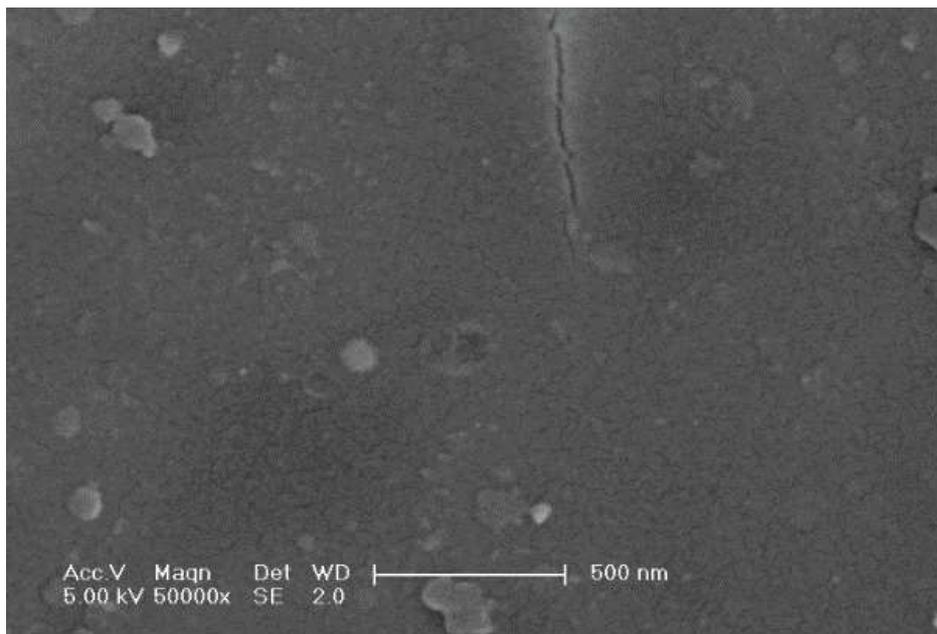


Figure 53 : micrographie en MEB. À plus fort grossissement, on vérifie l'aspect granulaire du film de PDA déposé sur le e-PTFE\_f

Les échantillons fonctionnalisés ont également été analysés en microscopie à force atomique (AFM) en mode « PeakForce Tapping » qui est censé ne pas abimer l'état de surface de l'objet scanné en raison des très faibles forces appliquées. Ces images topographiques ont permis de démontrer que le e-PTFE\_i présente bien des fibrilles qui sont enrobées de particules de PDA mesurant entre 35 et 60 nm. Par contre, le e-PTFE\_f est recouvert d'un film continu (entre les fissures) composé de particules de PDA de la même taille (figure 54). Enfin, en coupes transversales en MET, le film de e-PTFE\_f mesure environ 80 nm d'épaisseur.

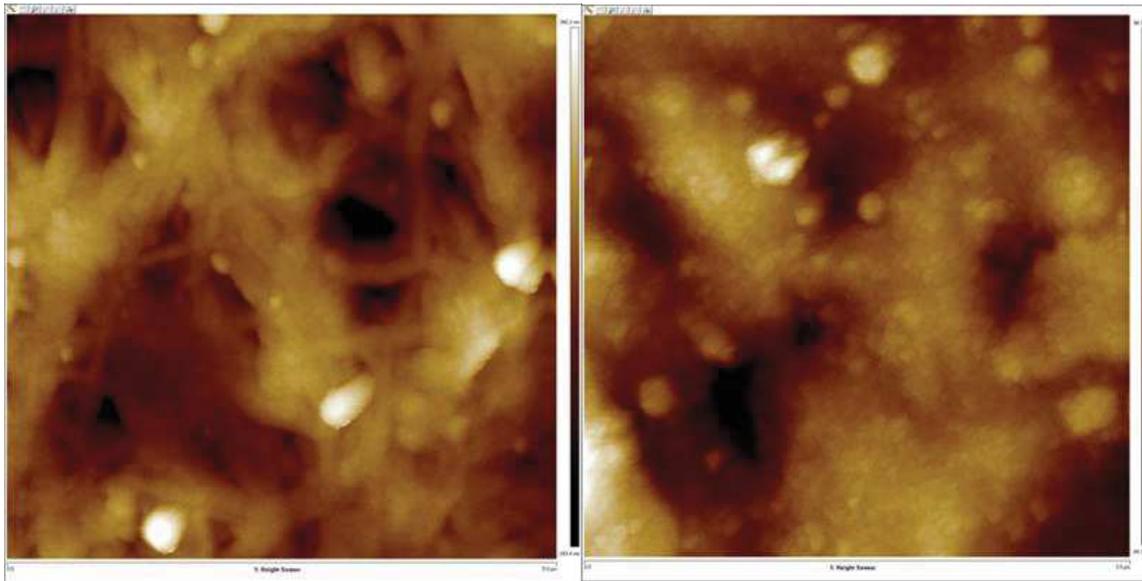


Figure 54 : images topographiques obtenues par AFM de la surface du e-PTFE\_i et e-PTFE\_f

Les propriétés mécaniques (module d'élasticité) ont également été mesurées pour les trois conditions : e-PTFE vierge ( $n = 20$ ), e-PTFE\_i ( $n = 14$ ) et e-PTFE\_f ( $n = 33$ ). Nous savons que le e-PTFE utilisé (Goretex® dualmesh) présente une composition bien spécifique avec des fibrilles qui se croisent en formant des nœuds (figure 55). Ainsi les mesures du module de Young dépendent de la zone sondée par la bille colloïdale : région fibrillaire ou nœud. L'histogramme des mesures effectuées (modules de Young), révèle ainsi une répartition bimodale de l'élasticité (figure 56 à 58). Des résultats similaires sont obtenus pour le e-PTFE\_i ce qui est cohérent avec l'aspect conservé de son architecture en MEB. Par contre, on retrouve cette répartition bimodale avec le e-PTFE\_f ce qui pourrait être plus surprenant au vu des données morphologiques obtenues en MEB, MET et en imagerie topographique AFM. Ainsi, même si morphologiquement, le e-PTFE\_f semble modifié par la présence du film, ce mode de fonctionnalisation ne modifie pas les propriétés mécaniques intrinsèques du e-PTFE dans sa forme Dualmesh® : la structure associant nœuds et fibrilles est préservée dans tous les cas. Les analyses statistiques ne laissent pas apparaître de différences significatives ( $p = 0,484$ ) entre les modules de Young des trois surfaces.

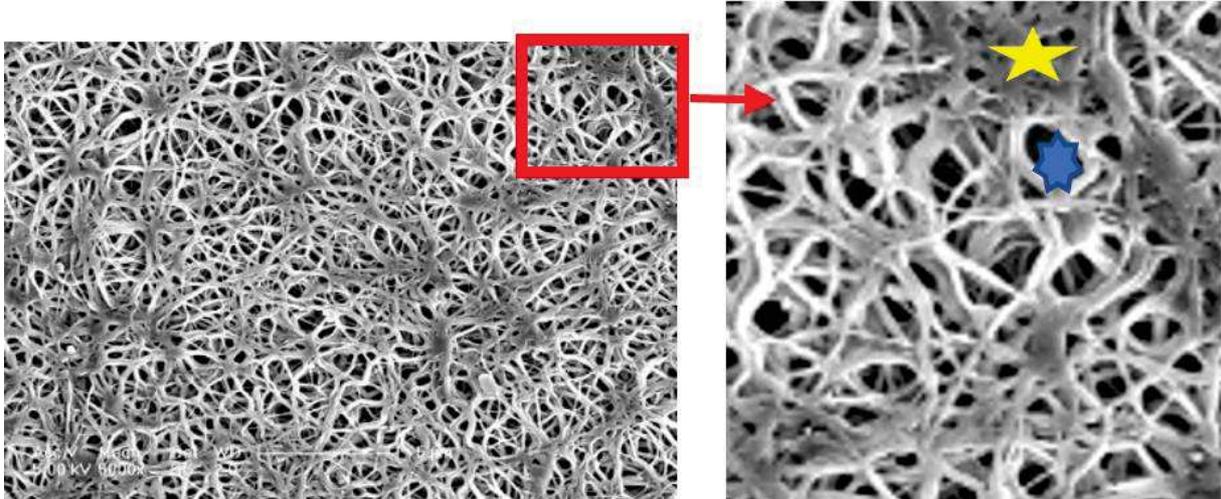


Figure 55 : micrographie en MEB montrant les hétérogénéités de la surface du e-PTFE : étoiles jaunes = noeuds interfibrillaires, étoiles bleues = espaces « vides »

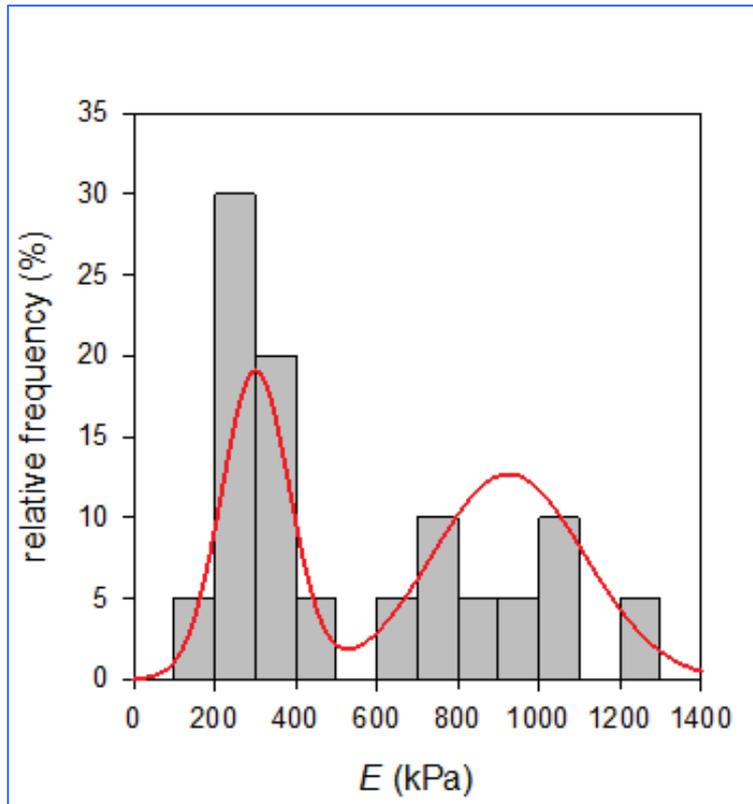


Figure 56 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young  $E$  du e-PTFE vierge ( $n = 20$ )

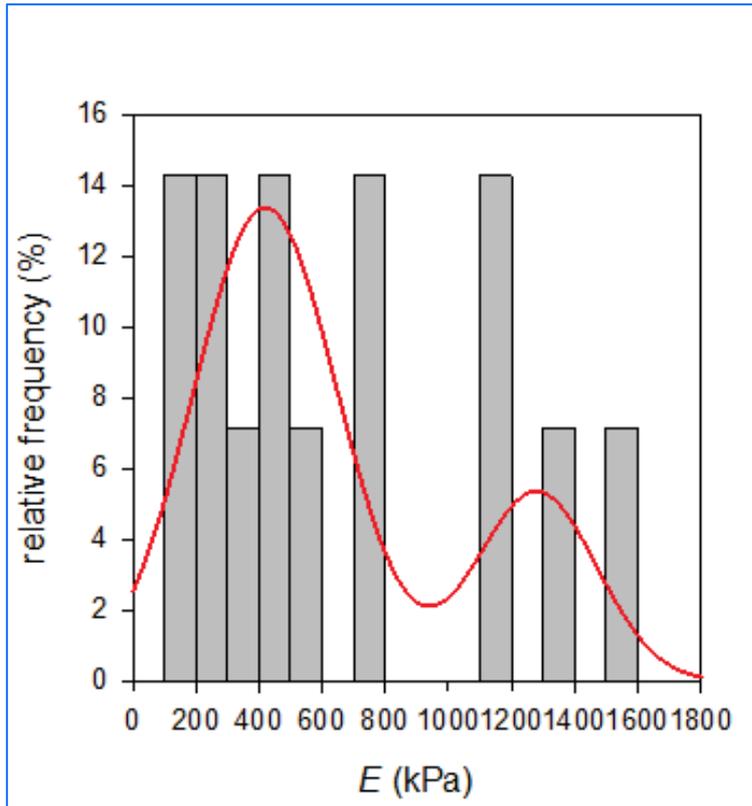


Figure 57 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young  $E$  du e-PTFE<sub>i</sub> ( $n = 14$ )

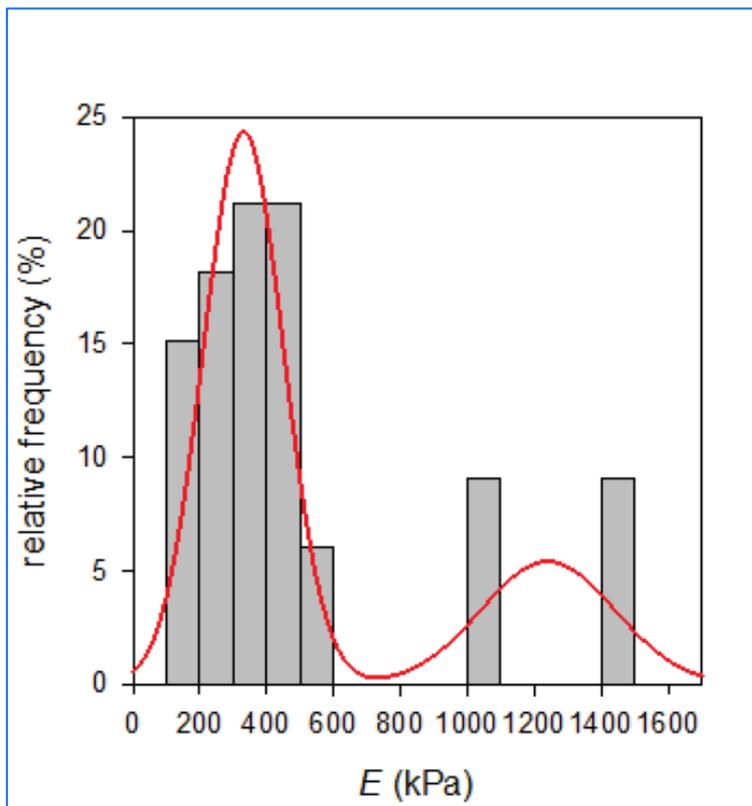


Figure 58 : histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young  $E$  du e-PTFE<sub>f</sub> ( $n = 33$ )

Ainsi, cette approche semble intéressante dans notre indication spécifique de remplacement diaphragmatique avec l'avantage majeur que la fonctionnalisation peut se faire sur une seule des deux faces sans modifier les propriétés mécaniques intrinsèques du e-PTFE. Toutefois, il faut noter que le film déposé présente une fragilité mécanique. Certaines équipes travaillent actuellement sur des voies d'amélioration de la robustesse de ce film (ajout de polymère dans la sous-phase par exemple) (75).

### **(3) Analyse de l'impact en termes de viabilité cellulaire et de réaction immunologique en présence de e-PTFE fonctionnalisé**

Afin de s'assurer de l'implantabilité du e-PTFE fonctionnalisé par la polydopamine, nous avons voulu étudier l'activité mitochondriale, la viabilité cellulaire et la production de cytokine inflammatoire lorsque des cellules sont en contact avec ce matériau comparé au e-PTFE natif.

Dans un premier temps, nous avons le choix de faire ces analyses sur des monocytes murins, l'idée étant d'aller, à terme, vers des tests in vivo sur souris.

#### Mesure de l'activité mitochondriale (reflet de la viabilité cellulaire)

Les milieux de culture et les suppléments proviennent tous de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Les cellules RAW 264.7 étaient un cadeau de S. Lazereg (ICSN, Gif sur Yvette, France). Les macrophages RAW 264.7 ont été cultivés dans du milieu DMEM AQ avec une teneur élevée en glucose (4500 mg/L) complétée par du sérum de veau fœtal (FBS) inactivé à la chaleur à 5 %, de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les cellules ont été maintenues dans un incubateur humidifié contenant 5 % de CO<sub>2</sub> à 37 °C. Pour les expériences, la concentration cellulaire a été ajustée à 10<sup>6</sup> cellules/ml et 10<sup>5</sup> cellules/puits et ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits. En tant que contrôle positif d'activation des macrophages, du LPS à 500 ng/mL a été utilisé, et en tant que contrôle positif des cellules

mortes, du DMSO à 5 % a été utilisé. Des échantillons d'e-PTFE ont été conservés au fond des puits au moyen d'anneaux en plastique stériles. Vingt-quatre heures après le traitement, l'activité mitochondriale a été évaluée à l'aide du test de prolifération cellulaire AQueous One en solution CellTiter 96® (Promega, Madison, WI). Après le retrait du surnageant, 100 µl de PBS 1X et 20 µl de solution de MTS ont été ajoutés par puits. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 40 minutes et l'absorbance a été mesurée à 490 et 700 nm sur un spectrophotomètre SAFAS (SAFAS, Monaco). La viabilité cellulaire a été déterminée en tant que rapport de densité optique entre les cellules de l'échantillon et les cellules des puits contrôles.

#### Mesure du taux de production de Nitrite

Le taux de nitrite (NO<sub>2</sub>) dans les surnageants de culture, sans cellules, reflète l'activité intracellulaire de NO synthase. Ce taux a été déterminé par réaction de Griess. Toujours dans les mêmes conditions de culture, 40 µL de surnageant ont été recueillis à partir de chaque puitsensemencé et 60 µL de réactif de Griess ont été ajoutés dans une plaque à 96 puits. L'absorbance à 542 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (SAFAS, Monaco). Les concentrations de NO<sub>2</sub> dans les surnageants ont été déterminées par comparaison avec une courbe standard.

#### Mesure de la production de cytokine inflammatoire

Pour déterminer les effets de la PDA sur la production de cytokines inflammatoires (TNF-α), les cellules ont été cultivées et traitées comme décrit précédemment. Les surnageants recueillis à partir des puits d'une plaque à 96 puits ont été dosés en utilisant un dosage par immunosorbant lié à une enzyme spécifique (ELISA). Le clone 1F3F3D4 d'anticorps anti-TNF purifié de souris et le clone XT 3 / XT 22 d'anticorps anti-TNF biotinylé de souris ont été

obtenus auprès de eBiosciences / thermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA). Avidine HRP était originaire de Jackson (West Grove, PA, États-Unis).

## Résultats

Concernant l'analyse de l'activité mitochondriale qui devrait refléter la viabilité cellulaire, nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les différentes conditions (figure 59). Néanmoins, les cellules observées au microscope simple révèlent une forme cellulaire différente en présence de PDA : les cellules tendent à « s'étaler » avec des prolongements dans différentes directions et des vacuoles dans les cellules ce qui ressemble beaucoup plus à des cellules activées (figure 60 et 61).

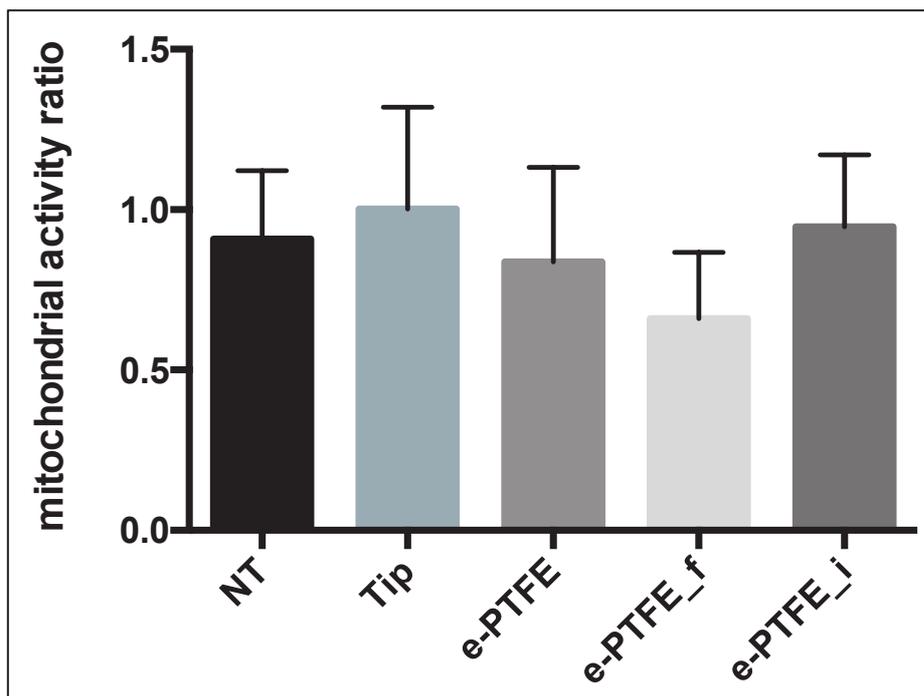


Figure 59 : activité mitochondriale exprimée en ratio d'une activité témoin en fonction des conditions testées. Le e-PTFE ou le e-PTFE modifié avec PDA ne semblent pas affecter l'activité mitochondriale et, par extension, la viabilité des cellules. Les cellules RAW 264.7 ont été incubées avec du e-PTFE ou du e-PTFE modifié par du DPA pendant 24 h avant que l'activité mitochondriale ait été évaluée à l'aide d'un test MTS. NT : non traité (ie: cellules seules). Tip : cônes de maintien des membranes au fond des puits. Activité exprimée en ratio d'une activité témoin (cellules seules)

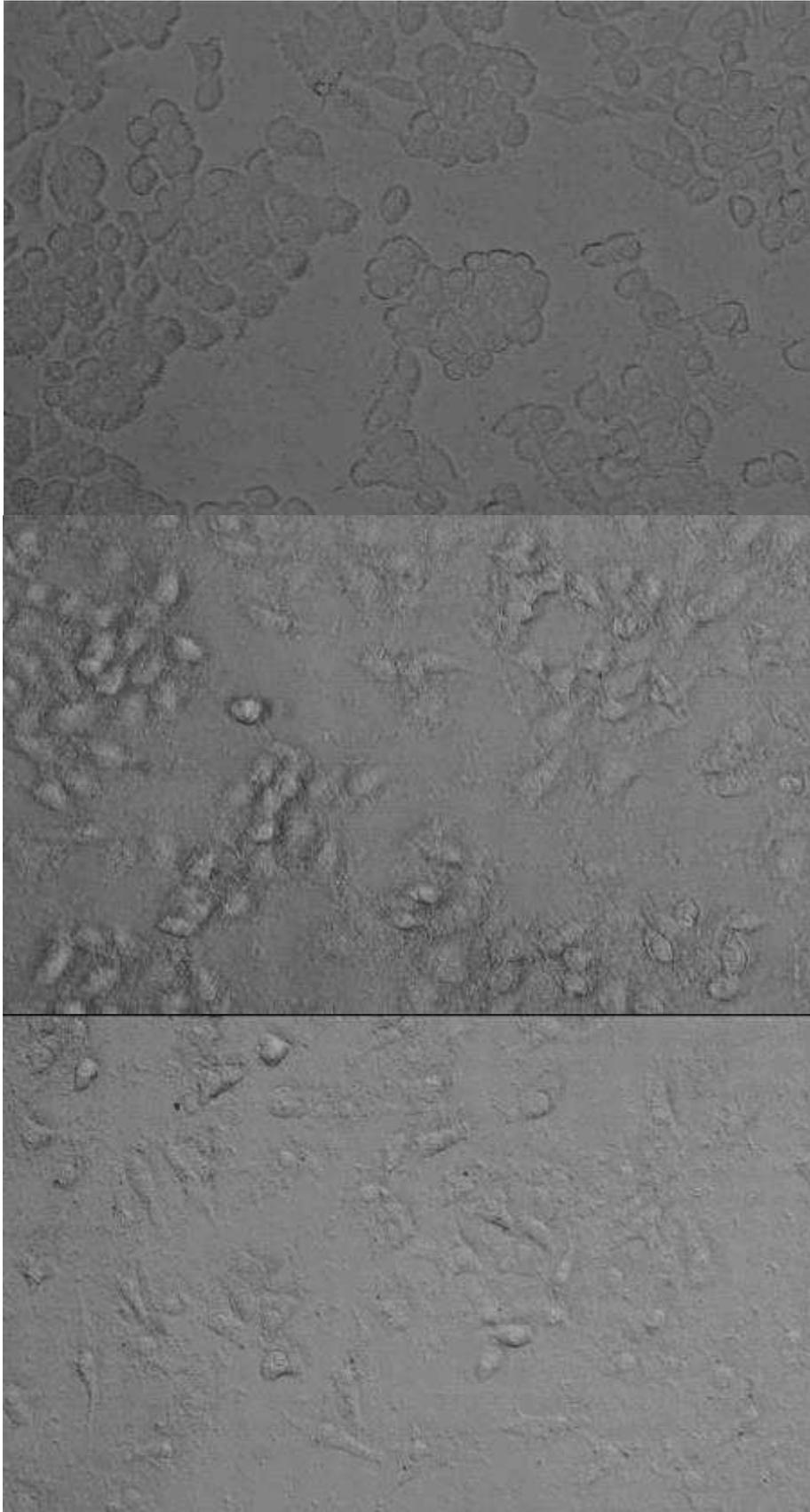


Figure 60 : analyses en microscopie optique de cellules vivantes sur e-PTFE (en haut), e-PTFE\_f (milieu) et e-PTFE\_j (en bas), respectivement ; Leica ; x 40. La forme des cellules RAW 264.7 change radicalement en présence de PDA

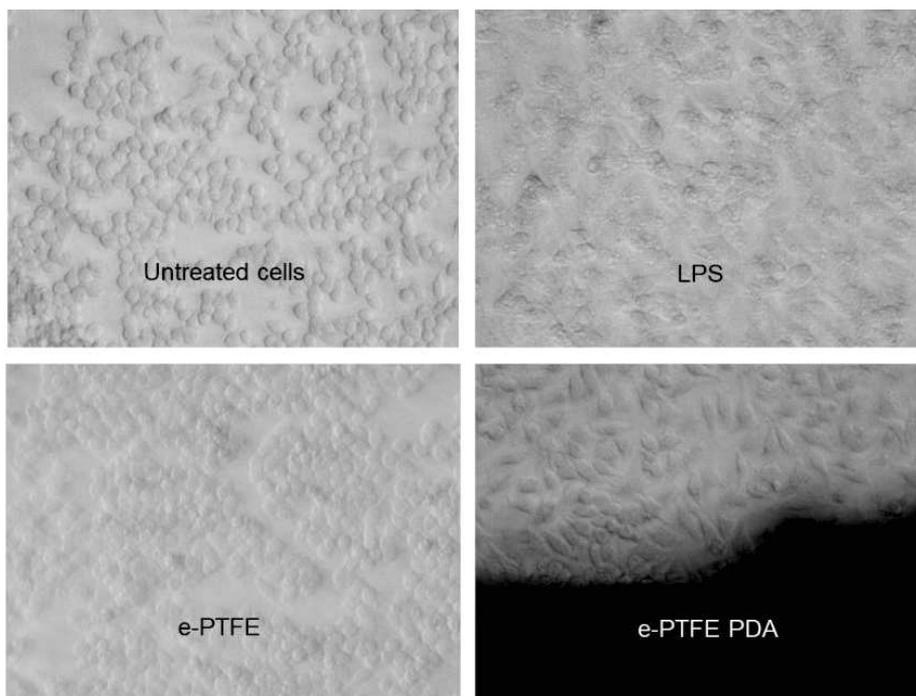


Figure 61 : mêmes analyses microscopiques : les cellules au contact du e-PTFE ne subissent aucune modification morphologique par rapport aux cellules contrôle (e-PTFE vs untreated cells). Par contre, en présence de PDA, on observe une modification de la morphologie même si elle reste moins marquée que notre contrôle positif, le LPS.

La mesure de nitrite quant à elle est difficilement interprétable sur nos premiers essais avec une forte variabilité du taux de Nitrite obtenu entre les différents échantillons de la condition e-PTFE\_i (figure 62).

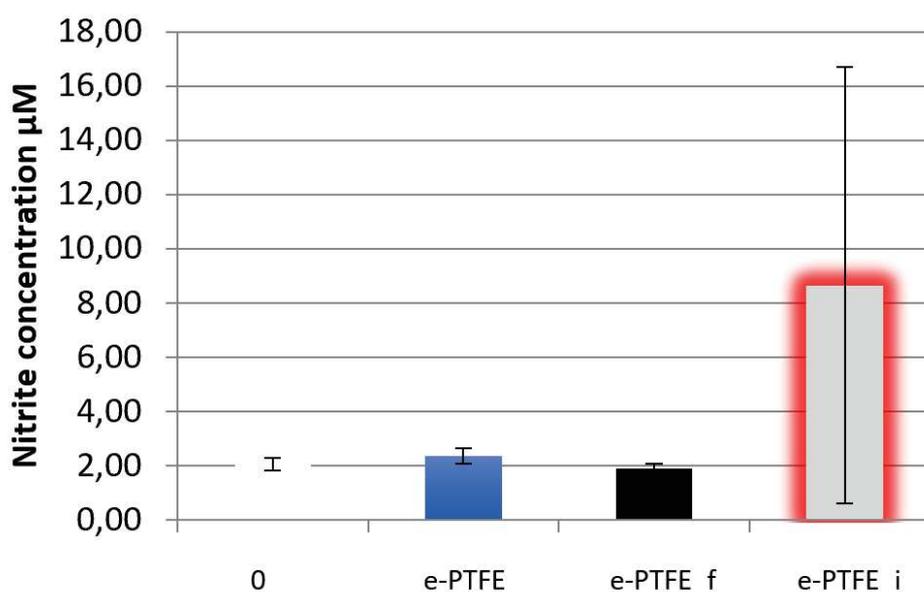


Figure 62 : taux de Nitrite mesuré dans les surnageants en fonction des conditions (n = 3). Nous observons une grande variabilité des taux de la condition e-PTFE\_i (Légende : 0, puit témoin)

Toutefois, nous avons réalisé d'autres séries l'année suivante avec les mêmes paramètres de mise en culture et de mesure de Nitrites (e-PTFE versus e-PTFE\_i). Seul le moyen de maintien du e-PTFE au fond des puits a été modifié avec l'utilisation de colle à bois au lieu des bagues plastiques. Au préalable la colle a été testée indépendamment afin de s'assurer de l'absence de toxicité induite par ce biais. Les patchs étaient alors collés la veille de l'ensemencement sous PSM. Sur cette seconde série, nous n'observons plus la différence obtenue précédemment avec le e-PTFE\_i (figure 63).

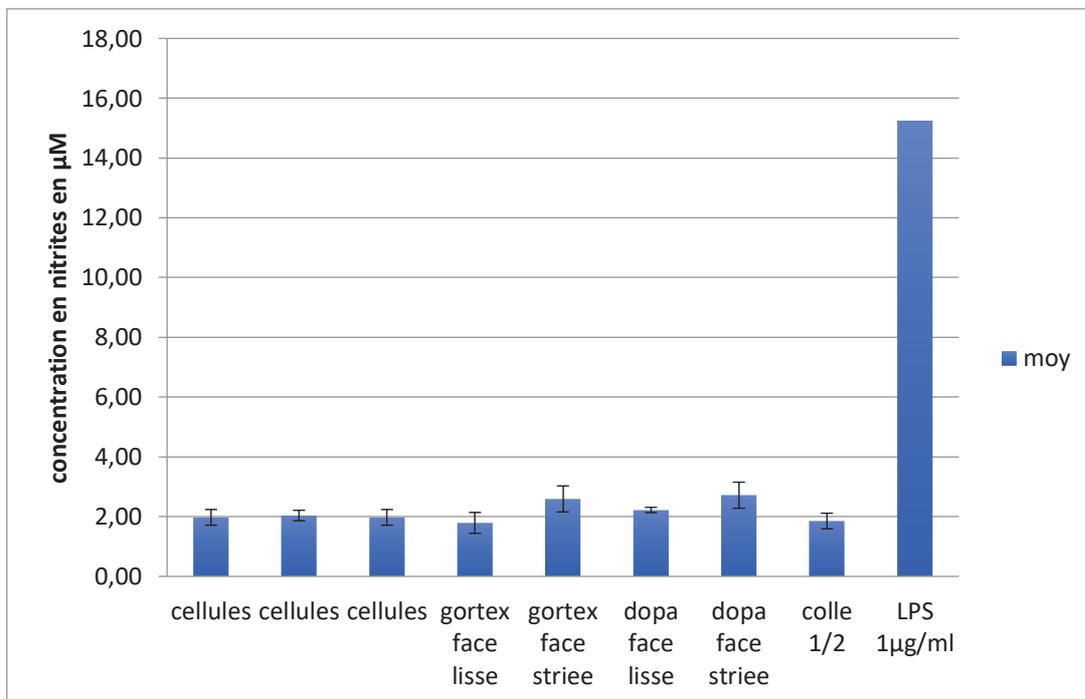


Figure 63 : taux de Nitrite mesuré dans les surnageants en fonction des conditions (n = 3). Nous n'observons plus de différence entre le e-PTFE natif et celui imprégné de PDA (Légende : Goretex vaut pour e-PTFE natif et dopa pour e-PTFE\_i)

Pour rechercher une réponse inflammatoire, la production de TNF- $\alpha$  a été déterminée par ELISA. Il semble qu'en présence de e-PTFE\_i, les cellules RAW 264.7 produisent du TNF- $\alpha$  (figure 64).

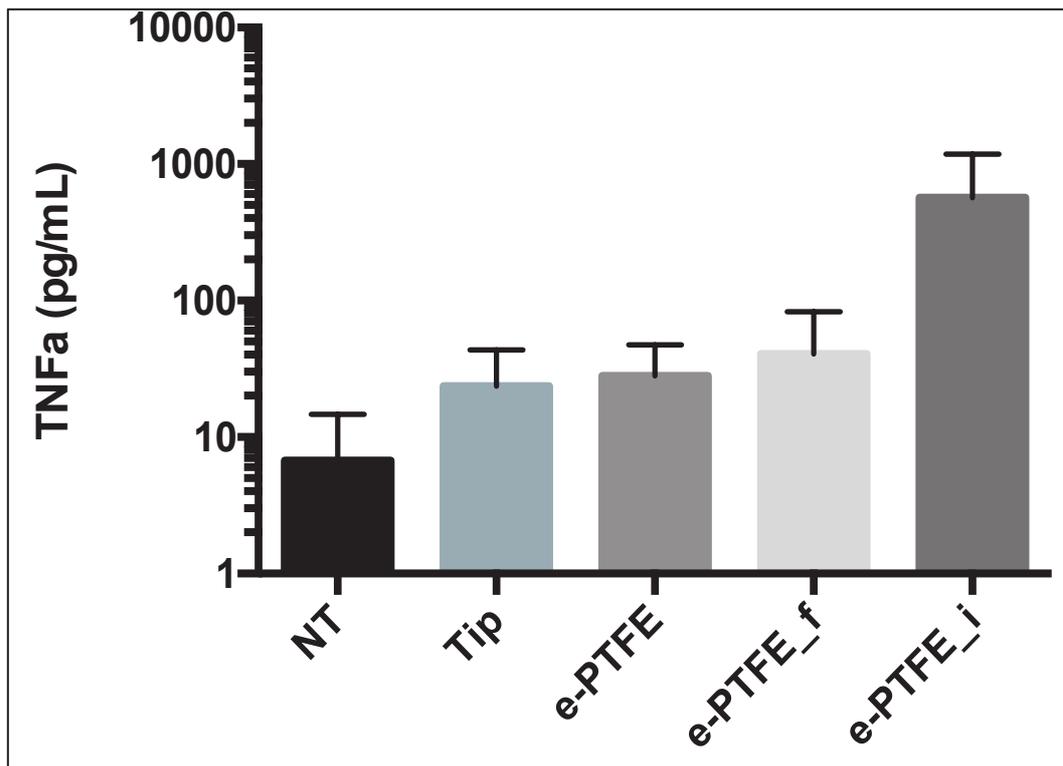


Figure 64 : dosage de la production de TNF- $\alpha$  selon les conditions de e-PTFE. Les cellules RAW 264.7 cultivées avec du e-PTFE fonctionnalisé par PDA semblent subir une activation, comme le montre la production de TNF- $\alpha$ . NT : cellules seules. Tip : cônes de maintien des membranes au fond des puits.

L'inflammation est une réponse normale et attendue lors de toute chirurgie et en particulier lors de la pose d'implants chirurgicaux. L'un des objectifs au développement d'un biomatériau est de permettre cette réaction sans aboutir à une réaction trop importante (comme la formation d'un granulome à corps étranger) (76).

#### Quelles hypothèses émettre devant ces résultats ?

Devant ces différents résultats, nous pouvons définir que :

- La fonctionnalisation par dopamine n'induit pas de mortalité cellulaire,
- La présence de PDA n'induit pas d'augmentation de l'activité intracellulaire de NO Synthase mais induit clairement une activation des monocytes murins caractérisée d'une part par une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  et par une modification morphologique évidente des monocytes (77)

- Cette activation semble dose dépendante sans que l'on puisse le démontrer à ce stade de notre recherche. L'hypothèse avancée est que le e-PTFE\_i est probablement plus riche en particules de PDA du fait de la surface majeure sur laquelle vont se déposer les particules de PDA suivant les irrégularités du PTFE en immersion (figure 65).

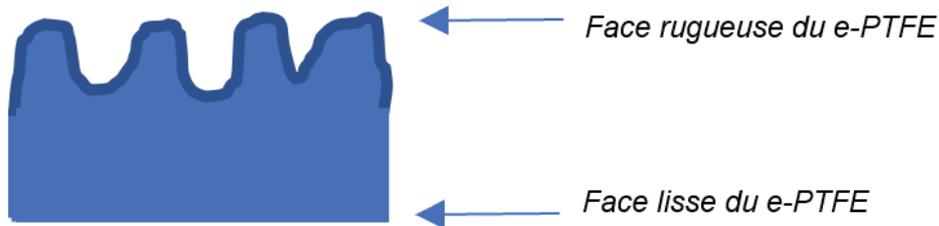


Schéma de  
Goretex® Dualmesh  
en coupe  
transversale avec la  
face rugueuse en

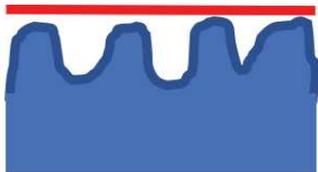


Schéma de Goretex®  
Dualmesh en coupe  
transversale avec la  
face rugueuse en  
haut, avec film de  
PDA

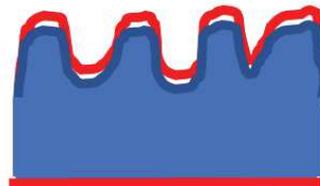


Schéma de Goretex®  
Dualmesh en coupe  
transversale avec la  
face rugueuse en  
haut, avec  
impregnation de PDA

Figure 65 : illustration de la répartition des particules de PDA à la surface du e-PTFE

#### **(4) Analyse de la réponse cellulaire**

Deux principaux types cellulaires humains sont utilisés pour la culture cellulaire :

- Des fibroblastes dermiques humains primaires obtenus par la méthode des explants à partir de prépuces humains. Ceci fait l'objet d'un protocole de recherche RIPH catégorie 3 ayant reçu l'avis favorable de la DRCI et du CPP en octobre 2017 sous la référence IDRCB 2017-A01913-50 « Influence des propriétés mécaniques et structurales du biomatériau sur l'intégration biologique de prothèses pariétales et caractérisations des matrices extracellulaires produites »
- Des cellules souches de la gelée de Wharton obtenues par lyse enzymatique à partir de cordons ombilicaux. (Numéro d'autorisation du Comité d'éthique : DC-2015-2364).

##### Fibroblastes dermiques humains

Les prélèvements sont obtenus frais et placés dans le milieu de culture (DMEM, SVF à 20 %, 1 % Glutamax® et 1 % pénicilline/streptomycine (v/v, Gibco)). L'extraction cellulaire est réalisée le jour même en utilisant la méthode des explants. Elle consiste à couper l'hypoderme en petits fragments de 2 mm<sup>3</sup>, qui vont être posés dans une flasque avec du milieu de culture. Les prélèvements sont placés dans un incubateur à 37 °C. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Le premier changement de milieu se fait au bout de 4-5 jours, puis environ 2-3 fois par semaine jusqu'à confluence des cellules ; ce qui est obtenu au bout de 2-3 semaines. Les cellules sont détachées en remplaçant le milieu de culture par de la trypsine (trypsine/EDTA à 0,5 %, Sigma) pendant 5 minutes à 37 °C. Si besoin les cellules sont stockées par congélation dans de l'azote liquide.

L'ensemencement est ensuite réalisé entre les passages 2 et 4 : la densité cellulaire est déterminée par comptage avec une cellule de Neubauer et s'exprime en nombre de cellules/mL. La concentration cellulaire est de 1.10<sup>4</sup> cellules/mL. Les cellules sont mises en

culture dans du DMEM, supplémenté avec 10 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de pénicilline/ streptomycine (v/v, Gibco), dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé toutes les 48 heures et la culture est arrêtée au bout de 6 jours par fixation primaire dans une solution de glutaraldéhyde 4 % et paraformaldéhyde 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4).

### Cellules de la gelée de Wharton

Les cellules souches de la gelée de Wharton sont isolées par la technique de lyse enzymatique de cordons ombilicaux humains fraîchement obtenus de grossesses menées à terme. Ces cellules sont ensuite amplifiées à une concentration de  $3.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture DMEM supplémenté avec 10 % SVF, 1 % pénicilline/streptomycine/amphotéricine B et 1 % Glutamax® (v/v, Gibco) et placées dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> avec un changement de milieu tous les deux jours.

L'ensemencement a lieu au 3ème passage et la concentration cellulaire est de  $1.10^4$  cellules/mL. Les cellules sont maintenues dans le même milieu de culture. La culture est arrêtée après 2 jours par fixation primaire avec glutaraldéhyde 4 % et paraformaldéhyde 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4).

### Résultats

Les observations en MET et en MEB ont révélé un contact très étroit entre la couche de fibroblastes et le e-PTFE fonctionnalisé. Les nombreux contacts focaux présentés par les cellules en culture mettent l'accent sur la fixation des cellules au revêtement de PDA à l'échelle nanométrique. En effet, sur le e-PTFE vierge, nous pouvons observer des cellules non étalées, isolées et en plus faible nombre alors que sur le e-PTFE<sub>i</sub>, on note un étalement généralisé des cellules (figure 66 et 67).

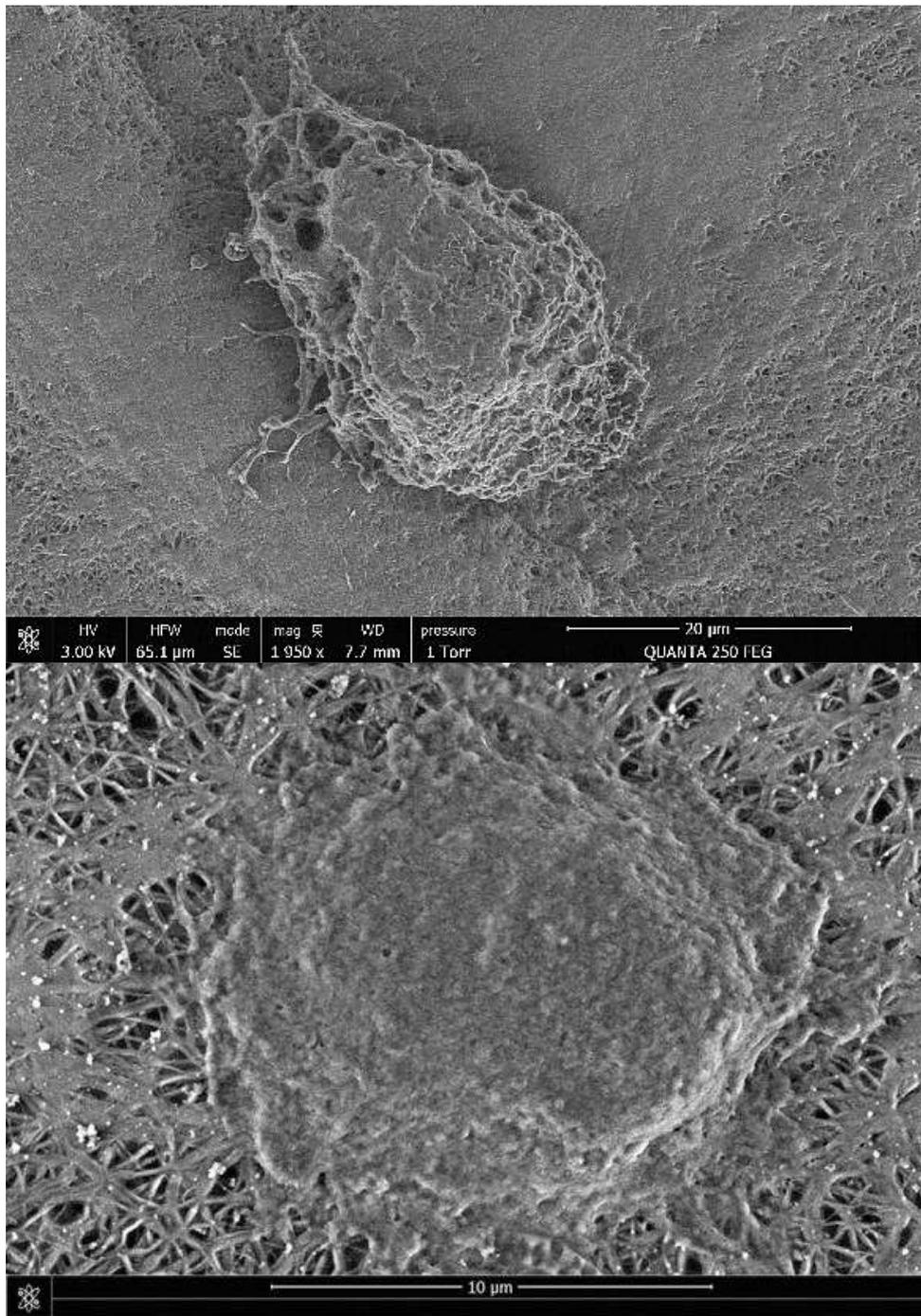


Figure 66 : micrographie en MEB (mode ESEM) d'une cellule souche de la gelée de Wharton WJ-SC à la surface de e-PTFE (en haut) versus e-PTFE<sub>j</sub> (en bas)

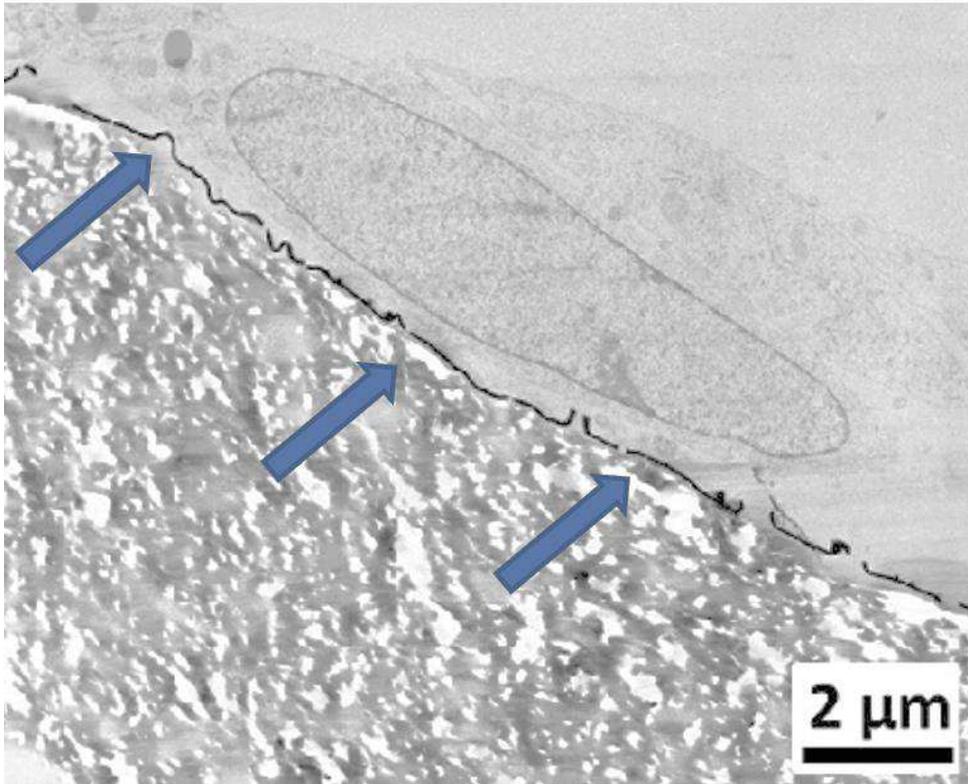


Figure 67 : micrographie en MET montrant la croissance de fibroblastes primaires à la surface de e-PTFE\_f. De nombreux contacts focaux des cellules en culture sont évidents à la surface du revêtement PDA nanométrique (flèches)

Lorsque les cellules ont été placées sur du e-PTFE qui était imparfaitement recouvert par une couche de PDA, on peut noter que les cellules se développaient préférentiellement sur les zones revêtues de PDA et, plus intéressant encore, envoyaient des projections cytoplasmiques vers le revêtement de PDA (figure 68).

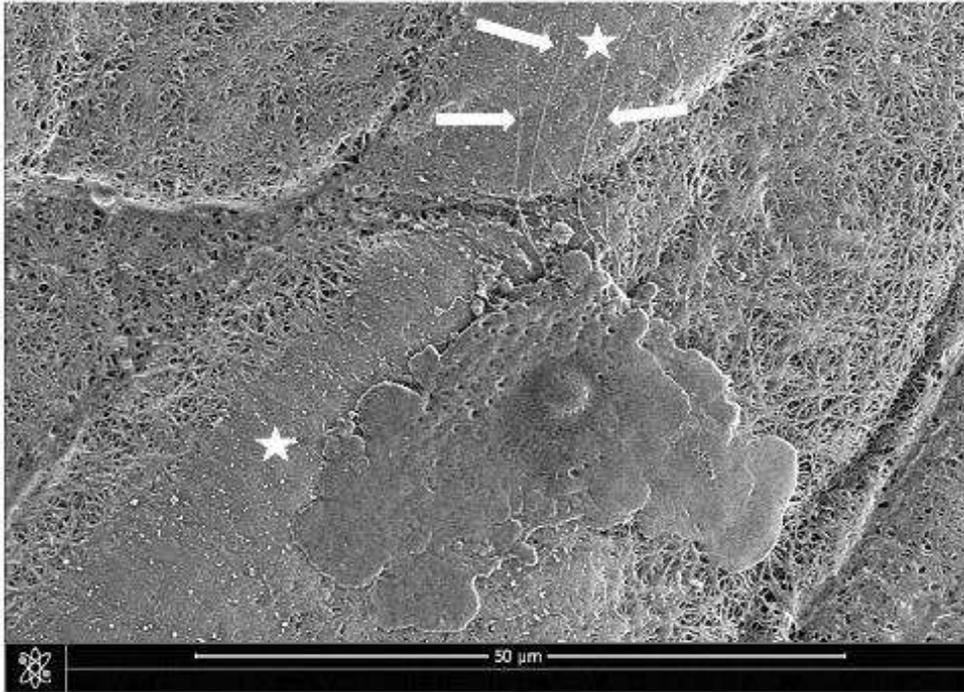


Figure 68 : micrographie en MEB (mode ESEM) montrant une cellule souche de Wharton dispersée sur e-PTFE\_f. On peut noter que les projections cytoplasmiques (flèche) sont orientées vers la zone revêtue de PDA (étoile)

Finalement, ces données morphologiques rejoignent en partie les données retrouvées en analyse de toxicité cellulaire et d'inflammation puisque là encore, on retrouve des cellules ayant tendance à « s'étaler » en présence de PDA. Ce support semble donc favoriser « l'accroche » cellulaire comme souhaité. Nous n'avons par contre pas de mesure de densité cellulaire comparant e-PTFE et e-PTFE fonctionnalisé.

#### **b) Fonctionnalisation biologique avec des membranes de « platelet rich fibrin » (PRF)**

Puisque nous sommes confrontés à une problématique de lâchage prothétique entre autre par défaut de colonisation tissulaire des prothèses implantées, nous cherchons à optimiser la colonisation précoce de ces prothèses par le tissu hôte. Nous sommes encouragés par nos observations précédentes mais nous faisons l'hypothèse qu'ajouter une fonctionnalisation biologique de ces prothèses par des membranes de Platelet Rich Fibrin (PRF) autologue

autoriserait un recouvrement tissulaire plus précoce et plus intense. Il s'agit de travaux totalement novateurs dans le domaine qui reçoivent le soutien moral et financier FIMATHO (filiale maladie abdomino-thoracique) et qui fait l'objet d'un protocole de recherche approuvé là encore par la DRCI et le CPP (PRI 2018 HECODIAP ID-RCB 2018-A01519-46 : Apport du PRF (Platelet Rich Fibrin) dans la prise en charge des hernies diaphragmatiques congénitales géantes de l'enfant avec fermeture par patch prothétique)

### **i) Rappels sur le PRF**

Le platelet rich fibrin ou PRF est un concentré de plaquettes obtenu après centrifugation du sang total sans anticoagulation. C'est un réseau tridimensionnel de fibrine riche en éléments d'approvisionnement tels que plaquettes, leucocytes, facteurs de croissance. (78-80).

### **(1) Historique**

Dés 1970, Matras et al décrit des colles de fibrines synthétisées à partir du plasma issu des banques de sang (81). Elles sont obtenues en reproduisant les dernières étapes des cascades enzymatiques de la coagulation avec transformation du fibrinogène en fibrine. Cependant, la concentration en fibrinogène du plasma étant faible, ces colles étaient instables et peu efficaces. Elles ont donc ensuite évolué en utilisant des techniques de cryoprécipitation du sang permettant ainsi d'obtenir un noyau de fibrine plus dense. L'utilisation clinique initiale de ces colles s'est limitée pendant de nombreuses années au traitement des hémorragies micro-vasculaires en chirurgie cardio-thoracique et vasculaire puis en chirurgie plastique et générale pour le comblement de plaies. Très vite les chirurgiens constatent qu'elles permettent une accélération du processus de cicatrisation. Cependant, le risque de transmission d'agents pathogènes en a limité l'utilisation (82). Tayapongsak décrit alors en 1994 une colle de fibrine

autologue (83). Sa technique est toutefois laborieuse puisqu'elle impose un prélèvement sanguin entre 1 et 3 semaines avant l'intervention et nécessite 2 jours de manipulation. Finalement, en développant ce procédé cherchant à obtenir un plasma riche en fibrinogène, Tayapongsak (1994) fut le premier à obtenir un plasma riche en plaquettes (84). La simplification des protocoles a permis l'avènement des PRP (Platelet Rich Plasma), appelés plus précisément cPRP pour Concentrated PRP (85) puisqu'ils résultent d'une double centrifugation pour augmenter la richesse en plaquettes à l'inverse des concentrés plaquettaires standards des banques du sang. La grande différence vient du fait que la prise de sang se fait cette fois-ci juste avant l'intervention puis un séparateur de cellules permet la transformation en concentré plaquettaire, combiné ensuite à de la thrombine et du chlorure de calcium afin de provoquer la polymérisation du produit. La législation française n'autorisant pas l'application directe de ces techniques, le concept a dû être modifié pour respecter le cadre législatif : c'est l'introduction du PRF en 2001 par Choukroun dont le protocole d'obtention est au plus simple (86).

## **(2) Rôle et impact de la centrifugation**

La centrifugeuse permet de décanter différentes particules suspendues dans une solution liquide en fonction de leur nature, de leur taille, de leur masse. Sous l'effet d'une rotation très rapide de vitesse angulaire  $\omega$  autour d'un axe, elles vont ainsi se déposer à des distances différentes du fond du tube : les particules les plus lourdes se retrouveront au fond du tube (ex : hématies) et les plus légères en surface, proches de l'axe de rotation (ex : fibrinogène) (figure 69). La force centrifuge ainsi produite engendre un champ G intense et horizontal largement supérieur au champ d'attraction terrestre (g) (85).

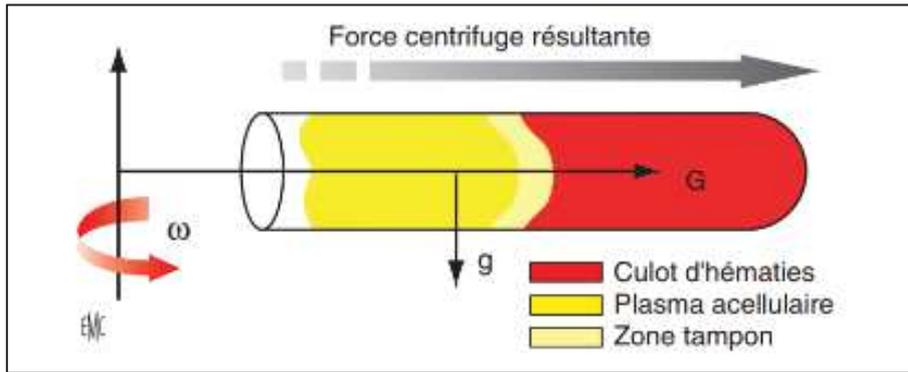


Figure 69 : les constituants du sang sont décantés selon leur masse et leur taille. Les plus gros et lourds se déposent au fond du tube (hématies) tandis que les éléments plus légers restent proches de l'axe de rotation (fibrinogène, fibronectine...). Selon Dohan and al (85)

La force de centrifugation se calcule ainsi :

$$g = w^2 r = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

w : vitesse angulaire (rad/s) =  $2 \pi V$  radians / seconde

r : distance à l'axe de rotation

n : nombre de rotations par minute (rpm)

Ainsi la force centrifuge exercée n'est pas la même d'un bout à l'autre du tube, plus on s'éloigne de l'axe de rotation, plus elle est importante. La centrifugation n'est cependant pas une méthode précise et fiable de séparation des éléments du sang. Elle agit selon un gradient de sédimentation des différents éléments et de nombreuses plaquettes sont piégées entre les hématies, simplement, leur concentration est statistiquement plus élevée dans la zone intermédiaire que dans la masse basale des hématies (éléments lourds et volumineux du sang) et la zone superficielle constituée de plasma acellulaire (molécules plasmatiques telles que fibrinogène, fibronectine, cytokines...). Pour affiner la séparation, il faudrait augmenter la force de centrifugation mais si cette dernière est trop importante, un pourcentage conséquent de plaquettes va s'activer et libérer immédiatement les facteurs de croissance. A 400 g le pourcentage d'activation des plaquettes est de l'ordre de 5 % seulement contre 40 à 70 % à

3000 g. Les protocoles essayent donc de maintenir des forces modestes comprises entre 160 g et 800 g, il en est de même pour les temps de centrifugation, ces derniers doivent rester suffisants pour permettre la séparation des éléments sanguins, soit environ une dizaine de minutes. Il n'existe peu de corrélation entre les critères de centrifugation et la qualité des concentrés plaquettaires. Les différences entre les résultats s'expliquent davantage par les grandes variations interindividuelles qui existent dans la constitution du sang.

### **(3) Modalités d'obtention du PRF**

Un prélèvement de sang total veineux est réalisé dans un ou des tubes de 10 ml sans anticoagulant (tube sec) et immédiatement centrifugé à des valeurs de 160 à 800 g (selon les équipes) durant 10 à 12 minutes selon les équipes. L'absence d'anticoagulant induit l'activation en quelques minutes d'une grande partie des plaquettes au contact des parois du tube. La cascade de coagulation se met alors en route. Initialement, le fibrinogène est concentré dans la partie haute du tube du fait de sa faible densité, avant que la thrombine circulante ne le transforme en fibrine : apparaît ainsi un noyau de fibrine en plein cœur de la masse de plasma acellulaire et bon nombre des plaquettes piégées au sein de ce noyau de fibrine. Finalement, le paramètre le plus influant sur la qualité du PRF obtenu est la rapidité du prélèvement, et de son transfert en centrifugeuse puisque sans anticoagulant, la cascade de coagulation débute dès que le prélèvement est en contact avec les parois du tube.

Ainsi au terme de la centrifugation, les tubes sont retirés de la centrifugeuse et les membranes de PRF vont pouvoir être prélevées (figure 70).

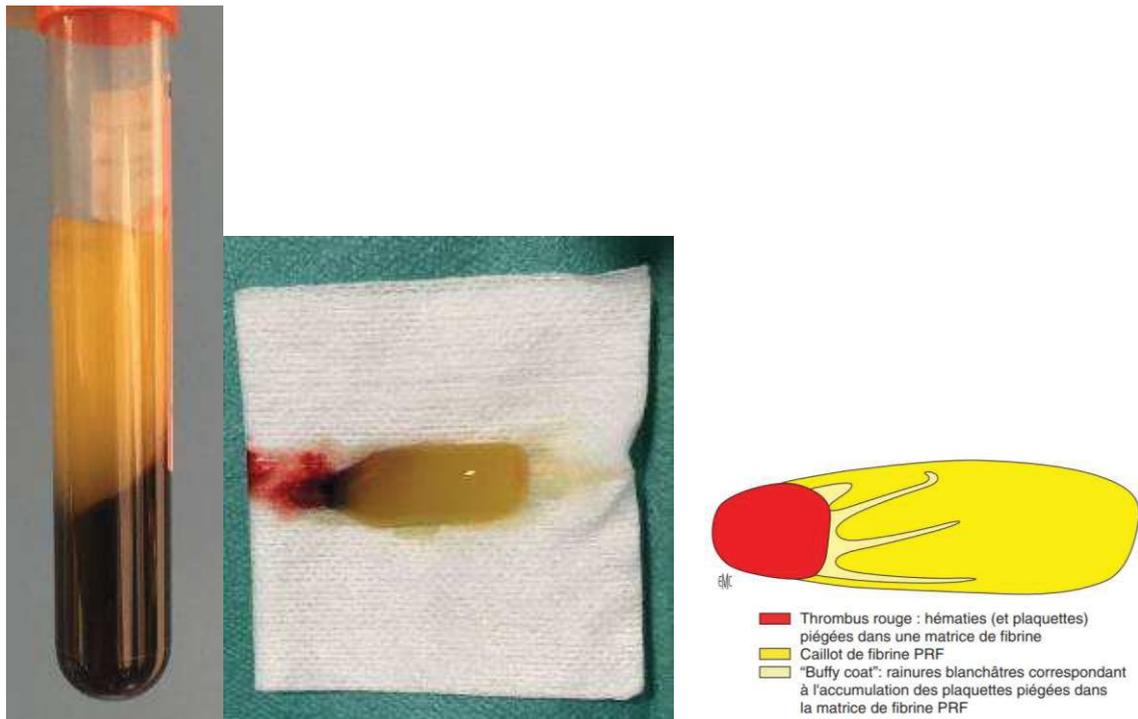


Figure 70 : illustrations d'une membrane obtenue après centrifugation puis séparée des éléments surnageants et du culot erythrocytaire. Schématiquement, cette membrane est constituée d'un thrombus rouge à la jonction du culot erythrocytaire, d'un caillot de fibrine et d'une zone transitionnelle appelée le buffy coat (à droite, d'après Dohan et al (85))

Le coagulum de PRF prélevé peut être utilisé de différentes manières : tel quel, sous forme de membrane ou encore de fragments que l'on peut par exemple mélanger à des fragments osseux (87). L'utilisation doit être immédiate ou le coagulum doit être congelé dans le cadre de la recherche pour une utilisation ultérieure.

#### (4) Composition du PRF

Le PRF présente une grande hétérogénéité, pour une même personne et entre individus (88) (figure 71). Sa composition varie également grandement en fonction des paramètres de centrifugation mais aussi en fonction du type de centrifugeuse (89), des conditions de manipulation...

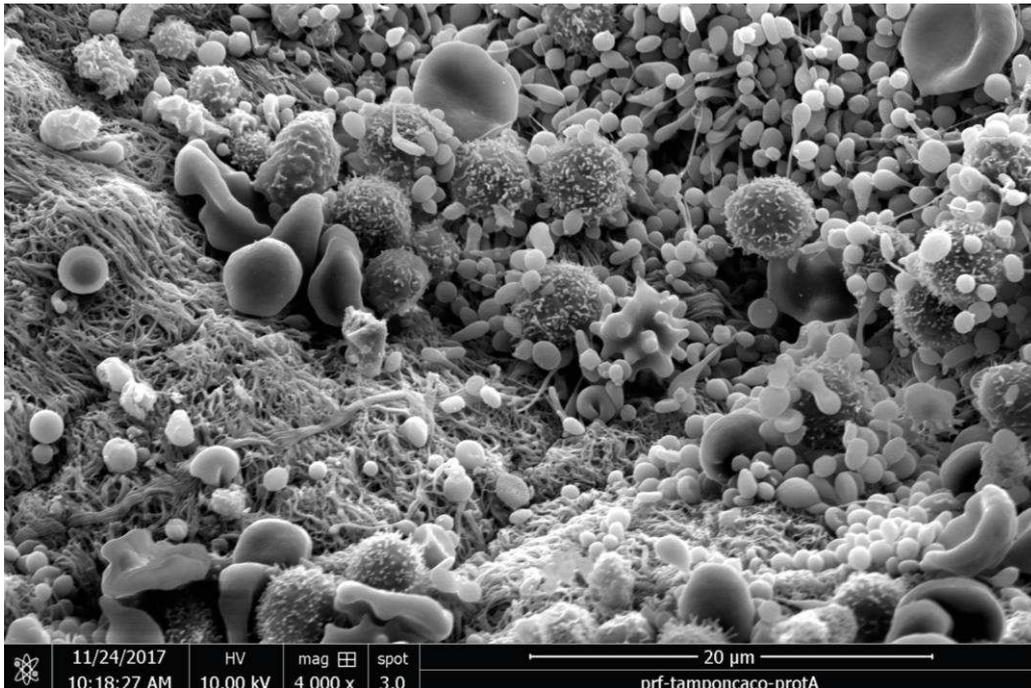


Figure 71 : micrographie en MEB d'une membrane de PRF humain : on y voit un réseau de fibrine avec de nombreux éléments cellulaires et molécules plasmatisques

### La fibrine

Forme active du fibrinogène, c'est une molécule soluble, circulant dans le plasma. Elle est constituée de 6 chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes  $\alpha$ A, deux chaînes  $\beta$ B et deux chaînes  $\gamma$ . Les chaînes identiques se lient par leurs extrémités N-terminales au centre de la molécule au niveau du domaine E. Les 2 extrémités contiennent elles les domaines C-terminales, sont globulaires et appelées les domaines D. Le domaine E est lié aux domaines D par des segments ou les chaînes sont en spirales (90) (figure 72).

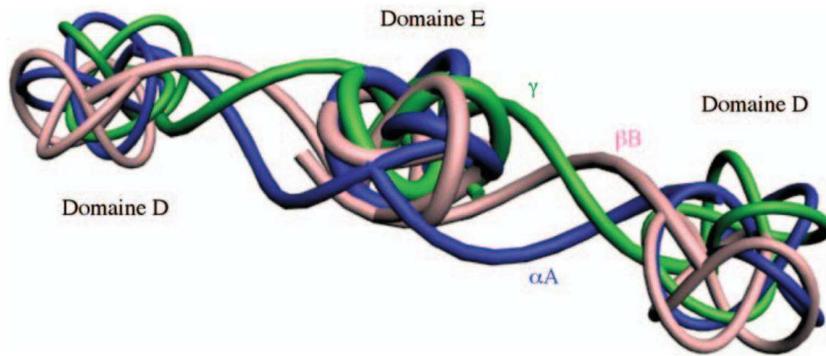


Figure 72 : modélisation en image de synthèse d'une molécule de fibrinogène. Selon Dohan et al (D-TEP© v1.3)

Le fibrinogène joue un rôle déterminant dans l'agrégation plaquettaire lors de l'hémostase et se transforme en « colle » capable de consolider l'amas plaquettaire, de fermer une brèche vasculaire. C'est le premier « pansement » naturel formé sur un site lésé.

Elle est indissociable de la cascade de coagulation activant les 12 facteurs de coagulation et aboutissant à la thrombine. En effet, la thrombine ainsi formée va jouer 3 rôles essentiels :

- amplifier sa propre formation en recrutant les plaquettes alentours et activant le processus de coagulation,
- cliver le fibrinogène soluble en monomère de fibrine permettant la polymérisation du gel de fibrine,
- activer d'autres cellules comme les leucocytes et les cellules endothéliales déclenchant le processus inflammatoire.

### Les plaquettes

Ces cellules sont formées dans la moelle osseuse à partir des mégacaryocytes. Leur durée de vie est de 8 à 10 jours. Les granules contenus dans leurs cytoplasmes seront libérés lors de l'activation. Ils contiennent de nombreuses protéines spécifiques dont du fibrinogène qui est donc présent dans les plaquettes et sous forme soluble dans le plasma. L'adhésion des

plaquettes à une surface lésée déclenche des signaux intracytoplasmiques qui aboutissent à 2 grandes réponses :

- l'activation des plaquettes qui de discoïdes deviennent sphériques puis « envoient » des pseudopodes,
- la sécrétion du contenu des granules dont le contenu va amplifier l'agrégation plaquettaire.

In vitro, la réaction est différente, il n'y a pas d'adhésion au sous-endothélium, c'est donc la voie intrinsèque qui intervient grâce à la surface de contact électronégative des silicates d'alumine, provoquant un changement conformationnel du facteur XII. Les tubes secs de prélèvement sont enduits de particules de silice enrobées d'alumine, cette contiguïté avec le sang, va entraîner une réponse du tissu hôte au contact de la surface étrangère : c'est la phase contact. L'adhésion de différents milieux entre eux s'explique par l'énergie de surface ou tension superficielle de toute surface. Le caractère hydrophobe/hydrophile de la surface est important, car le premier événement est l'adsorption par la surface artificielle d'ions inorganiques associés à des molécules d'eau. Les silicates d'alumine sont non-hydrosolubles mais hautement hydrophiles. Cette surface hydrophile en contact avec le sang va être modifiée par une couche d'eau, en rompant les interactions entre les chaînes de polymères.

### Leur répartition

Dohan et al a pu démontrer que la majorité des plaquettes et leucocytes sont piégés dans le noyau de fibrine dont une grande partie à la jonction du culot d'hématies et du PRF, zone charnière appelée « buffy coat » (91). Cette zone est donc importante et doit être respectée lors du prélèvement du PRF pour le garder intègre. Il est donc important d'être attentif sur les modalités de prélèvement du PRF à la sortie du tube. Plus on va ensuite se rapprocher du noyau de fibrine, plus les fibres de fibrine seront épaisses formant un maillage dense. Les

études cytologiques confirment une zone d'hypocellularité dans le tiers supérieur du PRF à l'inverse du tiers moyen.

### Les cytokines

Molécules d'une masse inférieure à 50 kDa, elles sont indispensables à la communication intercellulaire et par ce biais, à la cicatrisation. Les principales cytokines relarguées par les plaquettes activées sont des facteurs de croissance : transforming growth factor TGF  $\beta$ -1, platelet derived growth factor PDGF, insulin-like growth factor IGF, platelet derived endothelial cell growth factor PD-ECGF. Tous ces facteurs de croissance agissent sur la croissance cellulaire et la production de matrice extracellulaire.

### TGF- $\beta$

C'est un modérateur de l'inflammation, un puissant stimulateur de chimiotaxie des lymphocytes, monocytes, neutrophiles et fibroblastes. Il induit l'inhibition de la dégradation du collagène en diminuant la sécrétion des protéases et en augmentant les inhibiteurs des protéases. Il stimule la migration et la prolifération cellulaire, il permet la synthèse de molécules matricielles comme le collagène I et la fibronectine, par les ostéoblastes ou les fibroblastes. Il inhibe la prolifération des cellules épithéliales et stimule celle des cellules conjonctives (92).

PDGF accélère la fermeture précoce des plaies en stimulant la formation de dépôts de glycosaminoglycanes, d'acide hyaluronique et de fibronectine. Il participe à la synthèse de la matrice. Il a un rôle important dans la cicatrisation en potentialisant d'autres facteurs de croissance comme IGF-1 (93).

IGF stimule la prolifération et la différenciation cellulaire des fibroblastes et des cellules endothéliales. De même, IGF stimule la synthèse de collagène de type I (94).

Les cellules épithéliales possèdent le plus grand nombre de récepteurs à EGF. Les autres cellules cibles sont les cellules endothéliales et les fibroblastes, elles provoquent leur chimiotactisme et des effets mitogéniques (94).

D'autres cytokines sont quant à elles relarguées par les leucocytes : les interleukines (Il1, Il6...) et les facteurs de nécrose tumorale (TNF). Ces cytokines vont intervenir dans les processus inflammatoires inhérents à toute agression chirurgicale, et potentialisent ainsi la réaction locale.

De nombreuses études ont cherché à montrer la cinétique de relargage de ces cytokines en fonction des modes de préparation du PRF et comparativement à d'autres concentrés plaquettaires comme le L-PRF, le A-PRF ou encore le PRP. Toutes les études montrent que le relargage des cytokines est supérieur avec les PRF (L-PRF, PRF et A-PRF) par rapport au PRP et que, surtout, ce relargage est progressif et croissant sur au moins 10 jours (95-99).

Enfin, d'un point de vue mécanique, les membranes de PRF possèdent des propriétés intéressantes avec un module d'élasticité de l'ordre de 1000 kPa et une élongation jusqu'à rupture de l'ordre de 150% en conditions expérimentales (100) permettant ainsi à la membrane de résister aux contraintes d'un site opératoire et d'être suturée aux tissus environnants.

Dans notre contexte, étant donné les caractéristiques hydrophobes (et lipophobes) du e-PTFE, nous avons entrepris d'évaluer l'apport d'un revêtement de polydopamine sur le e-PTFE pour favoriser l'adhésion des éléments de PRF au biomatériau en attendant la colonisation cellulaire. Le but de ces investigations, conduites en microscopie électronique, est de comparer et caractériser le dépôt de PRF sur du e-PTFE traité ou non à la polydopamine.

## **ii) Analyses des PRF**

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'impact de la compression des membranes sur l'architecture de celles-ci tant ce paramètre nous semblait peu détaillé dans la littérature et potentiellement important sur la qualité de la membrane. Ensuite, nous avons comparé la structure du PRF en fonction de deux paramètres : la vitesse de centrifugation dans un spectre de valeurs utilisées en pratique clinique, et la zone d'intérêt : superficielle (proche du plasma liquide résiduel) et moyenne (ces deux zones correspondent au noyau de fibrine) et la zone profonde proche du culot erythrocytaire appelé buffy coat.

### **(1) Modalités d'obtention du PRF pour notre protocole**

Les membranes de PRF ont été obtenues par centrifugation d'échantillons de volontaires sains (figure 73). Huit échantillons de sang de 10 ml ont été prélevés dans des tubes secs spécifiques sans anticoagulant et immédiatement centrifugés pendant 12 minutes à 25 °C à différentes vitesses de centrifugation afin d'évaluer l'impact de ce paramètre sur l'architecture de la membrane. Les vitesses testées étaient de 1300 tr/min (200 G), 1500 tr/min (300 G) et 1800 tr/min (400 G) pour obtenir une membrane et 300 tr/min (40 G) pour obtenir un PRF liquide. La centrifugeuse utilisée était celle habituellement utilisée dans notre pratique clinique (thermo scientific centrifugal medifuge soft dec).

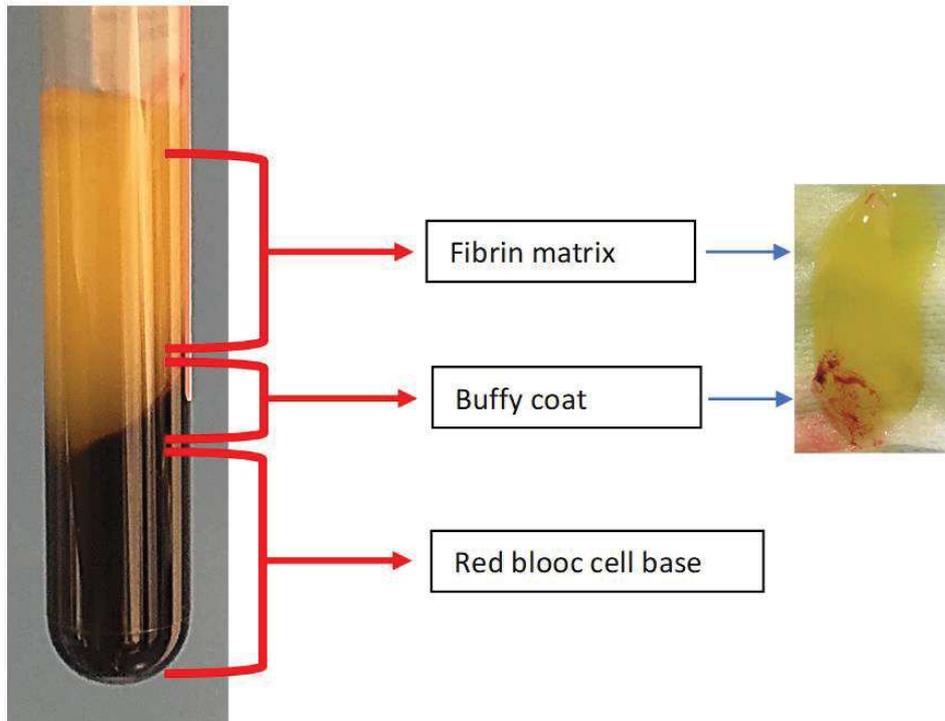


Figure 73 : illustration de l'obtention d'une membrane de PRF humain

Les membranes PRF obtenues ont ensuite été préparées selon la technique habituelle de notre service : prélevées stérilement dans le tube sec, elles sont ensuite couchées et orientées sur une compresse stérile non tissée puis comprimée manuellement et délicatement entre deux compresses stériles non tissées, la compression se faisant avec le dos d'une cupule en métal, elle aussi stérile. Ceci permet l'exsudat de plasma et nous obtenons ensuite une membrane « sèche ».

Les membranes ont ensuite été "scindées" dans des conditions stériles en zones supérieures et moyennes correspondantes toutes deux au noyau de fibrine et en zone inférieure correspondant à la couche leuco-plaquettaire décrite par Dohan (91) : le buffy coat. Chaque fragment a été immédiatement fixé dans du glutaraldéhyde à 4 % et du paraformaldéhyde à 1 % tamponné dans du cacodylate de sodium à 0,1 M à pH = 7,4. Après 3 lavages de 10 minutes dans le même tampon, les échantillons ont été post-fixés avec de l'acide osmique à 1 % dans une solution de cacodylate de sodium à 0,1 M pendant 45 minutes. Ces produits chimiques

ont été achetés à Euromedex (Souffelweyersheim, France). Ensuite, les échantillons ont été déshydratés en utilisant un séchage par contournement du point critique. La microscopie électronique à balayage a été réalisée après un revêtement or-palladium de chaque échantillon et fixation des échantillons à la laque carbonée. Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Quanta-250 (Société FEI, Eindhoven, Pays-Bas).

## **(2) Analyse en fonction de la compression**

Pour cette analyse, nous avons ainsi comparé trois séries d'échantillons provenant du même donneur lors d'un prélèvement unique : deux séries de membranes obtenues par centrifugation à 200 G durant 12 minutes et une série de PRF liquide obtenu par centrifugation à 40 G durant 12 minutes. Une des deux séries de membranes a été comprimée manuellement fortement et une selon le protocole habituel par une compression douce et contrôlée. Chaque échantillon a été ensuite préparé selon le protocole précédemment décrit pour une analyse en MEB.

Nous avons observé une variabilité dans l'apparence de la matrice tridimensionnelle en fonction de la compression manuelle exercée sur les membranes PRF, à savoir une matrice extrêmement dense avec des espaces interfibrillaires rares et fins, une architecture qui semble désordonnée lorsque la compression manuelle est trop forte. Lorsque les échantillons font l'objet d'une compression manuelle modérée, selon le protocole clinique d'utilisation, la matrice semble plus aérée, poreuse avec des fibrilles pouvant être bien individualisées. Enfin, sur les PRF liquides qui ne subissent alors aucune contrainte mécanique, la structure est extrêmement poreuse, presque organisée en nid d'abeille. D'autres éléments influencent

probablement l'aspect de la matrice de fibrine, comme la vitesse et le temps de centrifugation, mais il semble évident qu'une compression manuelle excessive nuit à la membrane et à son architecture tridimensionnelle, architecture qui joue un rôle essentiel dans les propriétés cicatrisantes du PRF (figure 74).

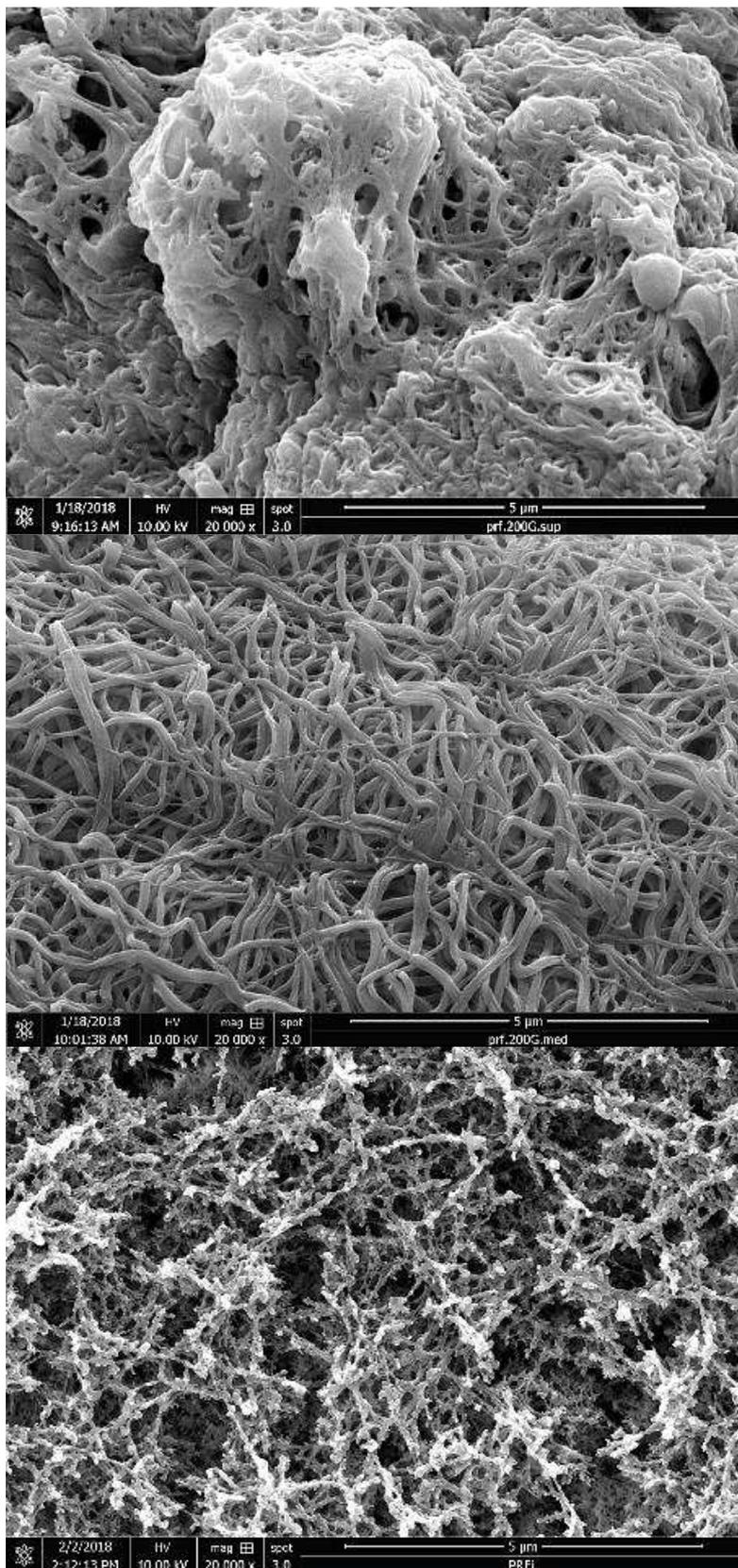


Figure 74 : micrographie en MEB. Variabilité de l'aspect du noyau de fibrine selon le degré de compression de la membrane : compression excessive (en haut), protocole habituel (milieu) et PRF liquide (en bas)

En 2010, Lucarelli et al évaluent l'influence de la compression et étudient la répartition des plaquettes et des fibres de fibrine après compression des membranes sur une plaque de verre (100). Les auteurs observent en MEB des fibres fortement pressées contre la surface en verre, formant des agrégats denses, sans pores. Gurbuzer et al, (101), confirment cette organisation et retrouvent des particules de silice au contact des plaquettes. Cet élément est à prendre en compte notamment à l'égard de la toxicité éventuelle des membranes. Ainsi nos données confirment celles de la littérature et soulignent l'impact que peut avoir une mauvaise manipulation sur l'architecture et de la composition des membranes de PRF. Une bonne connaissance des propriétés de ces membranes garantit une manipulation optimale de celles-ci pour en garantir un maximum d'efficacité.

### **(3) Analyse en fonction de la vitesse de centrifugation et de la zone d'intérêt**

Tout d'abord, nous sommes d'accord avec la description faite par Dohan et al sur la richesse en éléments cellulaires du buffy coat comparé aux zones supérieures et moyennes correspondant au noyau de fibrine, et ce, quelle que soit la vitesse de centrifugation (91).

Nous savons que ce buffy coat se situe juste au-dessus du culot de globules rouges dans le tube collecteur. Si la section n'est pas précisément à la jonction de ces deux structures, nous pouvons observer un caillot massif de culot érythrocytaire riche en polyhedrocytes piégés dans un réseau riche en fibrine (figure 75). Cela pourrait interférer avec le rôle de régénération tissulaire des PRF en créant une interface physique entre le site receveur et la membrane elle-même (102) et nous devons nous rappeler à nouveau, que le prélèvement et la préparation des membranes de PRF doivent être aussi précis que possible. Une section transversale de la membrane de PRF nous montre la densité des éléments cellulaires piégés dans la matrice de fibrine dans la zone du buffy coat (figure 76).

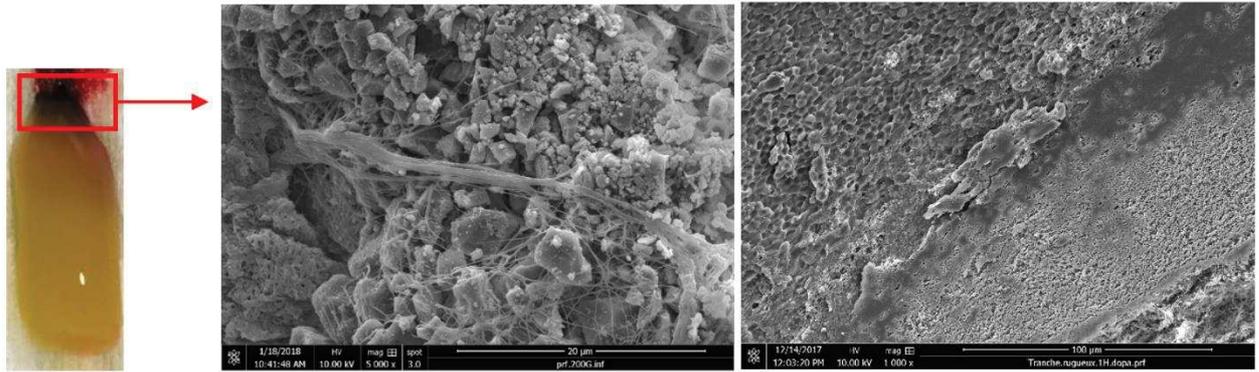


Figure 75 : photographie et micrographie en MEB de la zone de jonction avec le culot erythrocytaire, riche en polyhédrocytes trappés dans le noyau de fibrine

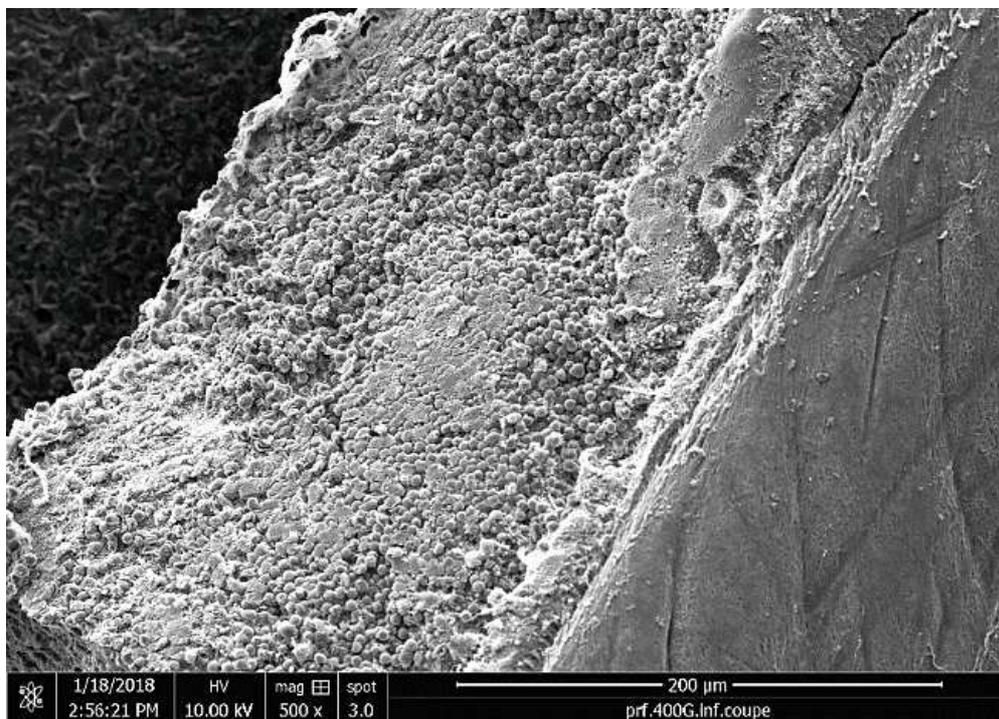


Figure 76 : micrographie en MEB d'une tranche de PRF à hauteur du Buffy coat ; x 500. On constate la densité d'éléments cellulaires « piégés » au sein du réseau de fibrine.

La vitesse de centrifugation semble jouer un rôle dans l'activation plaquettaire avec des modifications morphologiques progressives (figure 77). Parallèlement à cela, nous trouvons une polymérisation de la fibrine lorsque les plaquettes semblent activées (103). Ainsi, la morphologie des plaquettes semble être modifiée par les processus d'agrégation et de coagulation avec une relation étroite entre la fibrine et les plaquettes après la coagulation.

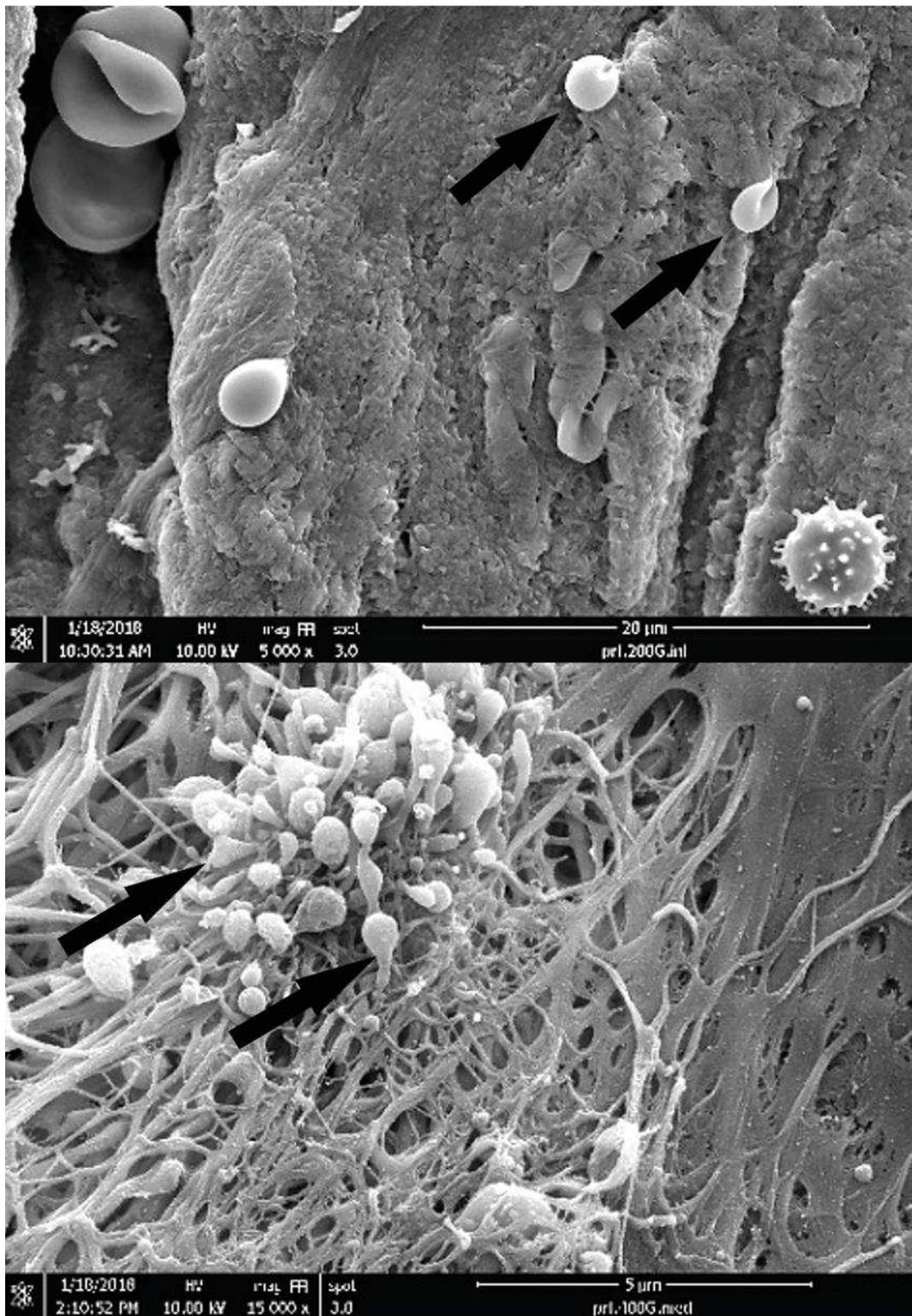


Figure 77 : micrographie en MEB. Nous savons que les plaquettes sont des cellules anucléées de 2 à 5 µm de diamètre, discoïdes lorsqu'elles sont inactives (flèche, image du dessus) et s'étirant et émettant des prolongements lorsqu'elles sont activées (flèche, image du dessous) puis s'agréant. Parallèlement, la matrice de fibrine semble polymériser simultanément à cette activation plaquettaire (aspect granuleux de la matrice sur l'image du dessous comparativement à l'image du dessus)

Enfin, le diamètre des fibres et leur orientation semblent liés à la vitesse de centrifugation puisque le PRF liquide a de fines fibres en nid d'abeille, non alignées alors qu'avec l'augmentation de la vitesse de centrifugation, les fibres semblent de plus en plus épaisses et semblent s'orienter. Cependant, ceci n'a pas été parfaitement reproductible au sein de nos différents échantillons et pourrait aussi être lié à d'autres paramètres tels que les vibrations (89).

### **c) Analyse de l'interaction PRF-PDA**

#### **i) Analyses structurales**

La méthode de préparation des PRF reste inchangée. Après préparation des membranes, elles ont immédiatement été déposées sur des patchs stériles de e-PTFE et e-PTFE<sub>i</sub> de 1 cm<sup>2</sup> préparés eux aussi selon le procédé précédemment décrit. Les échantillons ont été placés dans des plaques à 24 puits dans 1 ml de solution de DMEM. La fixation de l'échantillon a été réalisée après 1 heure de dépôt, 8 heures et 24 heures suivant le même protocole que précédemment : fixation dans du glutaraldéhyde à 4% et du paraformaldéhyde à 1 % tamponné dans du cacodylate de sodium à 0,1 M à pH = 7,4. Après 3 lavages de 10 minutes dans le même tampon, les échantillons ont été post-fixés avec de l'acide osmique à 1 % dans une solution de cacodylate de sodium à 0,1 M pendant 45 minutes. La microscopie électronique à balayage a été réalisée après un revêtement or-palladium de chaque échantillon après déshydratation en utilisant un séchage au point critique.

Pour réaliser l'analyse MET, les échantillons ont été incorporés à la résine. Afin d'augmenter l'imprégnation de la résine, nous avons utilisé de la résine Spurr (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), de viscosité inférieure à celle de la résine Epon. La composition du mélange Spurr utilisé (adapté à cet échantillon) était la suivante: 5,90 g de NSA (anhydride succinique de nonène), 4,10 g de ERL4221 (résine époxyde cycloaliphatique), 1,59 g de DER 736 (éther

diglycidylique de polypropylèneglycol) et 0,1 g DMAE (diméthylaminoéthanol) comme accélérateur. Les échantillons de E-PTFE ont été transférés dans une résine Spurr 1 volume / éthanol absolu 2 volumes pendant 30 minutes, une résine Spurr 1 volume / éthanol absolu 1 volume pendant une heure et enfin dans une résine Spurr à 100 % pendant 2 heures. Après une nuit dans 100 % de résine Spurr, les échantillons de e-PTFE ont été incorporés dans une résine fraîchement préparée et polymérisés pendant 48 heures à 60 °C. Pour pouvoir réaliser des coupes ultra-minces, nous avons réduit autant que possible la taille des échantillons de e-PTFE, puis avons ré-incrusté les éprouvettes découpées à l'aide de la résine susmentionnée. Les coupes ultra-fines ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome automatique Reichert Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Nanterre, France) équipé d'un couteau en diamant. Les coupes ultrafines ont été chauffées doucement à 45 °C pendant 3 minutes en plaçant le couteau diamant sur une plaque chauffante (Lab-Line Instruments Inc., Ill, USA) pour éliminer les plis possibles. Des sections ultra-minces ont été collectées sur des grilles MET de 100 mesh recouvertes de carbone et colorées dans une solution à 5 % d'acétate d'uranyle (Euromedex, Souffelweyersheim, France) pendant 20 minutes. Après rinçage à l'éthanol à 50 %, les grilles ont été colorées en double dans une solution de citrate à 4% de plomb pendant 10 minutes (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

La microscopie électronique à transmission a été réalisée à l'aide d'un instrument Philips EM 208 (FEI Company, Eindhoven, Pays-Bas) fonctionnant avec une tension d'accélération des électrons de 70 kV. Les micrographies ont été enregistrées sur des films Kodak SO163 et numérisées avec un scanner Epson Perfection V500 PRO (Epson France, Levallois-Perret, France).

## Résultat

Quelle que soit la durée de contact entre PRF et e-PTFE (1 h, 8 h, 24 h) et la vitesse de centrifugation, nous avons constaté un dépôt continu de PRF sur e-PTFE et e-PTFE<sub>i</sub>. Les

observations en MEB montrent clairement une meilleure « rétention » des éléments du PRF (cellules et matrice extracellulaire) à la surface du e-PTFE lorsque celui-ci est imprégné de PDA avec l'impression d'une véritable adhésion du PRF aux particules de PDA en coupe transversale au MET (figure 78). Par ailleurs, les cellules changent de morphologie au contact des particules de PDA pouvant correspondre à une activation de celles-ci par la PDA. Ceci confirme nos données sur l'analyse des réactions immunologiques et de viabilité cellulaire au contact du e-PTFE et du e-PTFE\_i. En effet, nous avons pu prouver que la présence de polydopamine n'influe pas sur la viabilité cellulaire en présence de macrophages murins mais que ceux-ci semblaient par contre activés avec l'augmentation de production de TNF- $\alpha$  et une modification morphologique, deux paramètres qui semblaient dose-dépendants. On confirme là la modification morphologique des globules blancs du PRF au contact de la polydopamine et donc une probable activation de ceux-ci.

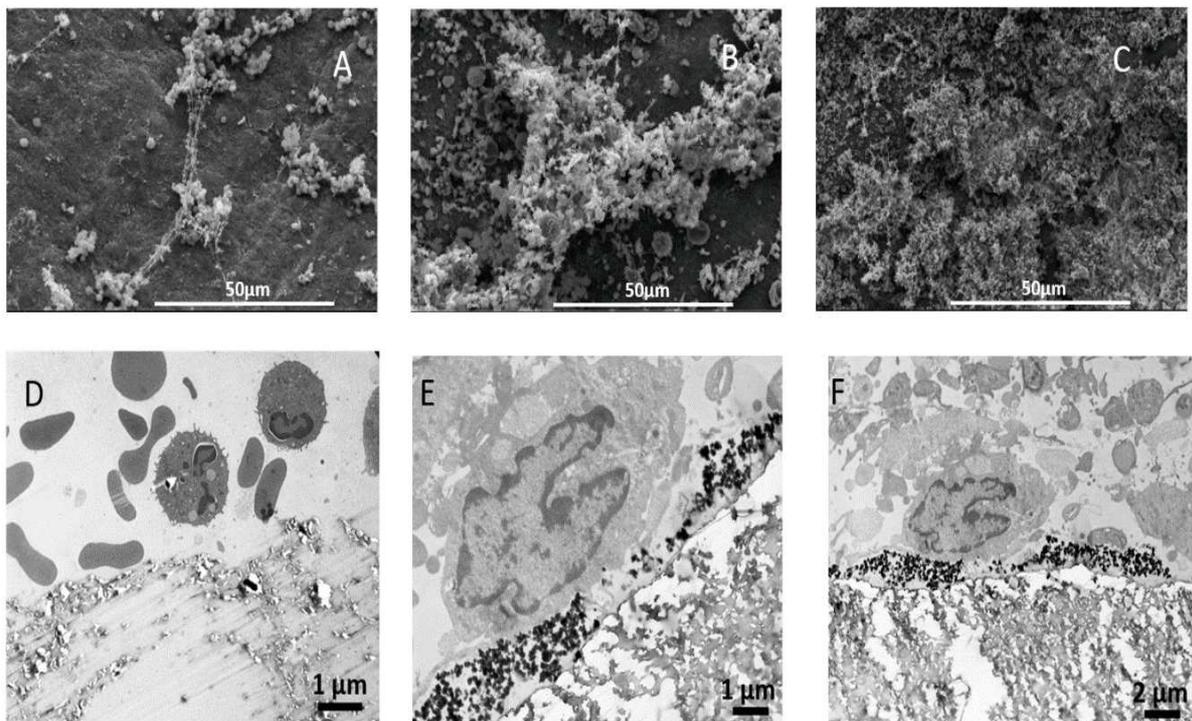


Figure 78 : observations en MEB et MET de l'interaction entre PRF et PDA à la surface du e-PTFE après 8 heures de dépôt : de rares éléments de PRF semblent retenus à la surface du e-PTFE natif (A et D) alors que ces éléments semblent plus denses et plus intimement fixés en présence de PDA (B, C et E, F)

Un élément intéressant pour la pratique clinique est la « rétention » importante du PRF liquide sur les bandes rugueuses du e-PTFE en présence de PDA. En effet, les cultures cellulaires montrent systématiquement une meilleure colonisation cellulaire des bandes lisses de la face rugueuse par rapport aux bandes rugueuses qui semblent comme trop « chaotiques » pour que les cellules parviennent à confluer. La rétention accrue du PRF liquide sur ces zones pourrait fournir aux cellules un support biologique à leur confluence (figure 79).

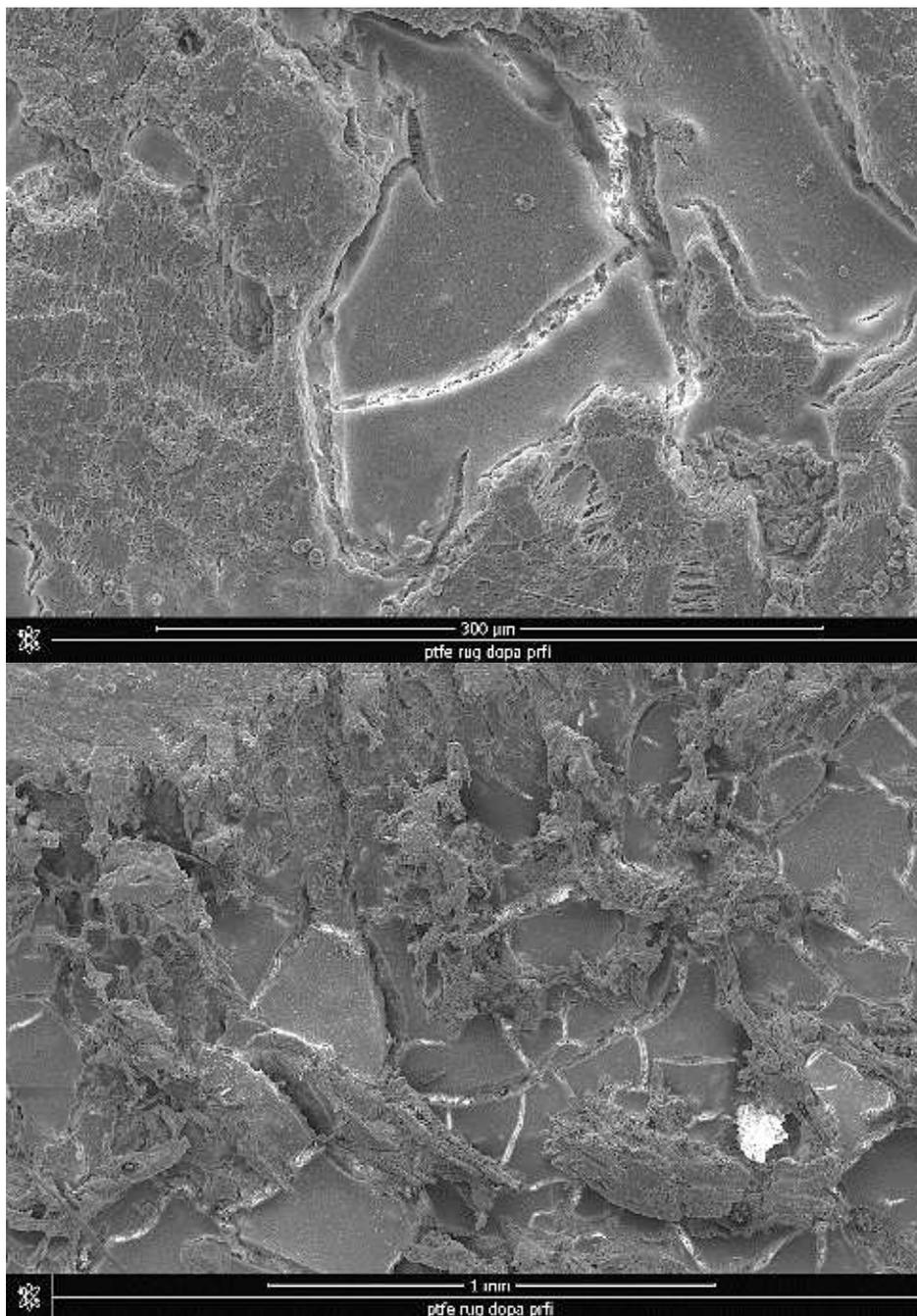


Figure 79 : micrographie en MEB. On observe une rétention de la matrice du PRF liquide à la surface des bandes rugueuses de la face rugueuse du e-PTFE

## **ii) Viabilité cellulaire et marqueurs d'inflammation**

Pour l'heure nous n'avons pas pu explorer la voie biologique sur cet axe de recherche. En effet, le PRF est un tissu biologique riche en cellules de l'immunité utilisé uniquement en implantation autologue. Les analyses de viabilité cellulaire ou de marqueur d'inflammation se font dans notre expérience avec des macrophages murins rendant incompatible les éléments immunologiques. De même, nous avons tenté 2 séries de culture in vitro de cellules de lignées humaines (fibroblastes BJ et fibroblastes gingivaux HGF) sur du e-PTFE (avec et sans fonctionnalisation PDA) en présence de PRF avec, comme attendu, une apoptose de l'ensemble des cellules, apoptose secondaire à l'incompatibilité immunologique entre les éléments identitaires du donneur et ceux de la lignée (figure 80).

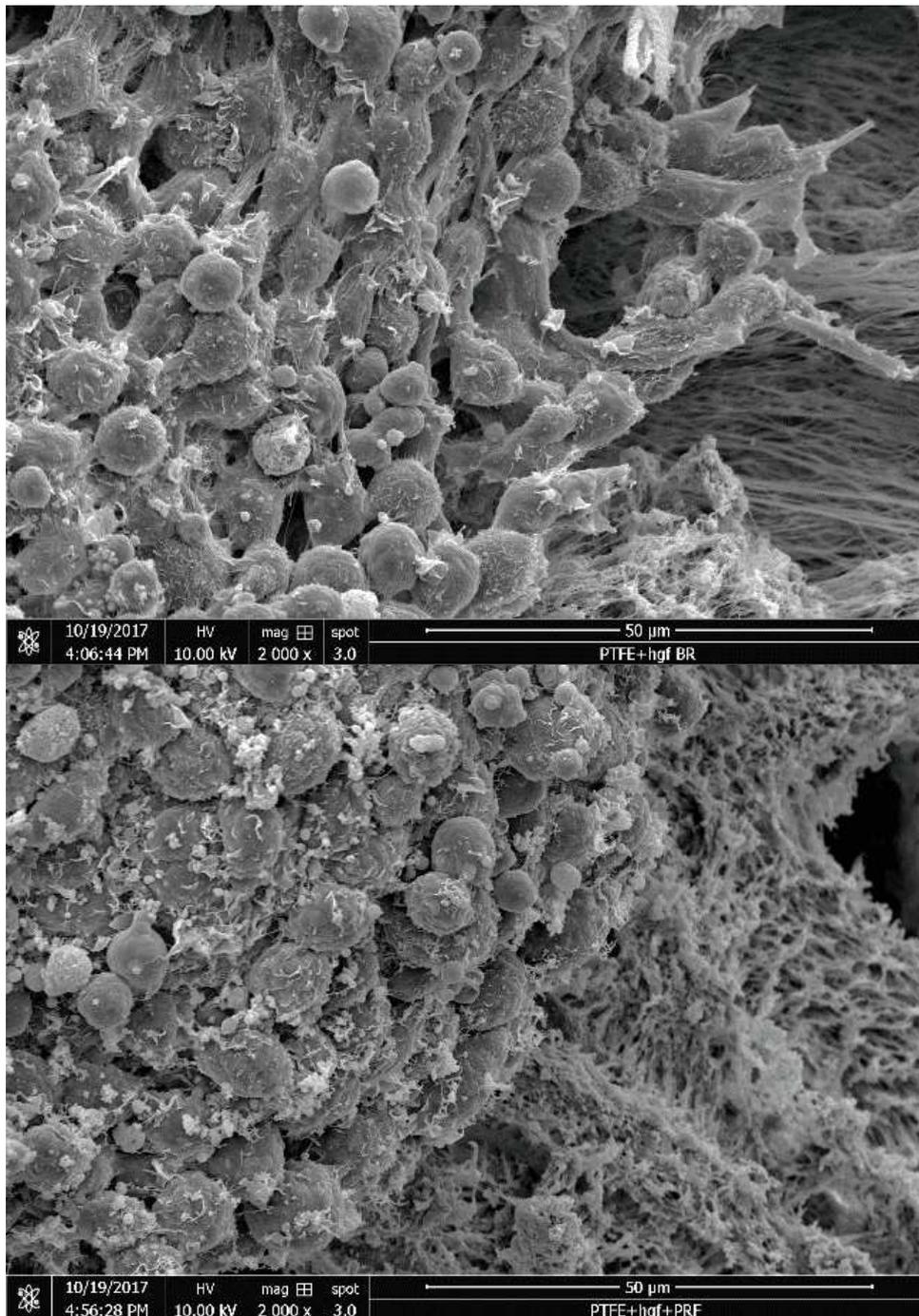


Figure 80 : micrographie en MEB. Culture de cellules HGF sur e-PTFE sans PRF en haut et avec PRF en bas. On constate des cellules ayant tendance à s'allonger en haut alors qu'en présence de PRF les cellules sont en état apoptotique, rondes, en amas, sans aucune migration

### Perspectives :

Il est certain que l'analyse biologique de cette voie de recherche imposera que l'on puisse utiliser des cellules et du PRF provenant du même « individu » afin de s'affranchir de toute réaction immunitaire en lien avec l'identité immunologique du PRF.

#### **d) Conclusions et perspectives**

Le e-PTFE n'est pas la prothèse diaphragmatique idéale. Il est préféré de par sa biocompatibilité, sa résistance, la possibilité de moduler la réponse tissulaire sur chacune des deux faces. Cependant, il manque d'élasticité, son intégration biologique est modérée et hétérogène selon les zones de plus forte contrainte mécanique. Ne pouvant améliorer ses propriétés mécaniques, nous avons cherché à moduler ses propriétés biologiques afin d'optimiser son intégration. Nous avons donc évalué plusieurs voies de recherche et avons pu définir quelques avancées prometteuses :

- la fonctionnalisation chimique par la polydopamine n'altère pas les propriétés mécaniques du e-PTFE,
- elle augmente l'hydrophilie du e-PTFE, n'altère pas la viabilité cellulaire
- elle promeut l'inflammation se traduisant, d'un point de vue expérimental par l'augmentation de production de TNF- $\alpha$  par les macrophages et par une modification de leur morphologie
- les cellules semblent mieux adhérer sur les zones fonctionnalisées et « envoient » des pseudopodes en direction de ces zones
- le PRF est un support à la cicatrisation connu mais dont l'impact est variable en partie de par sa grande variabilité inter et intra-individuelle, mais aussi de par l'hétérogénéité des protocoles
- les paramètres de centrifugation et de préparation influencent sa qualité en tout cas d'un point de vue architectural. Ces paramètres sont probablement à prendre en compte en pratique clinique
- le PRF présente une zone particulièrement intéressante représentée par le buffy coat, intéressante de par sa richesse en éléments cellulaires et en fibrine
- les cellules leucocytaires du PRF semblent activées au contact de la polydopamine

- la polydopamine favorise la rétention du PRF à la surface du e-PTFE

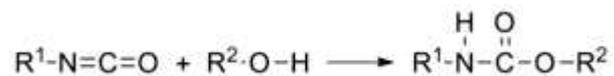
## 5) MISE AU POINT D'UN BIOMATERIAU INNOVANT

Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec l'équipe de l'ICPEES (Guy Schlatter, Anne Hebraud, Master 2 de Rodolphe Migneret) et l'iCube (Nadia Bahlouli, Hamdi Jahl).

### a) Choix du matériau et de la technique de fabrication

#### i) Le Polyuréthane thermoplastique (TPU)

Le polyuréthane est un élastomère thermoplastique devenu d'utilisation courante dans l'industrie médicale. Les polyuréthanes connaissent une expansion industrielle incroyable au cours du XXe siècle. Ils sont particulièrement intéressants de par l'infinie variété de texture et de dureté que l'on peut obtenir en variant les monomères utilisés et en ajoutant d'autres substances. Il est couramment utilisé en santé, par exemple pour la fabrication de chambres implantables, de sondes urinaires... Il a l'avantage d'allier les propriétés élastiques des élastomères et les propriétés mécaniques des plastiques. C'est un polymère d'uréthane, molécule organique obtenue par la réaction d'un isocyanate et d'un alcool conformément à la réaction suivante :



La composition du polyuréthane est déterminée par trois composants : polyol, diisocyanate et extenseurs de chaîne. Il forme ainsi un ensemble de chaînes dures alternant avec des chaînes souples (figure 81).

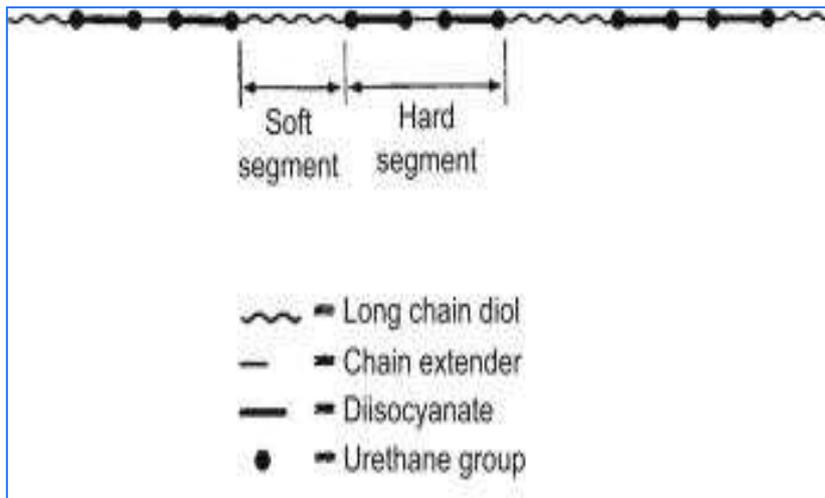


Figure 81 : représentation schématique du TPU composé de diisocyanate, de chaînes longues diol et d'alternance de chaînes dures et souples. Tiré du mémoire Master 2 R Migneret

A basse température, les segments souples sont responsables de l'élasticité du système et les segments durs sont responsables à la fois de la réticulation physique et agissent en tant que charges renforçantes. La proportion de segments durs déterminera de nombreuses propriétés telles que la dureté, le module d'élasticité, la résistance à la rupture et la température supérieure d'utilisation. Par exemple, le module de Young peut être élevé, allant de 2 à 100 MPa et l'élastomère de TPU peut avoir une grande flexibilité et une grande élasticité (104).

Ainsi le Polyuréthane a retenu notre attention dans cette recherche de part sa biocompatibilité, la possibilité pour nous de faire varier résistance et élasticité pour répondre à notre cahier des charges.

Le TPU traité par électrofilage a déjà été utilisé en santé, par exemple comme prothèse vasculaire (105) avec des résultats intéressants aussi bien d'un point de vue mécanistique que biologique (106). Au-delà, Bergmeister et al on évalué l'importance de la porosité d'une prothèse en polyuréthane électrofilé pour la qualité de la migration cellulaire (107).

## ii) Choix de l'électrofilage

Nous avons ainsi fait le choix de produire nos membranes de TPU par électrofilage.

L'électrofilage (figure 82 et 83) permet de fabriquer des membranes non tissées à partir de polymères et donc de polyuréthane. Le diamètre des nanofilaments varie entre quelques nanomètres et quelques micromètres. Il est possible d'obtenir toutes sortes de géométries de membranes pour des applications très variées : textile, biomédical, cosmétique, énergie ou encore agroalimentaire.

La première étape est la solubilisation du polymère. Une fois en solution, un débit contrôlé sera appliqué à la seringue contenant la solution. Habituellement, la distance entre l'aiguille et le collecteur (à la terre) est comprise entre 10 et 20 cm. Sous les charges à la surface de la goutte, la solution de polymère formera un cône de Taylor en raison de l'interpénétration des chaînes de polymère, puis un jet de solution sera éjecté de ce cône. Au début, le jet va droit, mais après 1 ou 2 cm, le jet effectue un mouvement de fouet. Ces mouvements ont deux conséquences : le jet sera étiré permettant au solvant de s'évaporer et les fibres atteindront un faible diamètre en arrivant sur le collecteur de manière pseudo-aléatoire.

Cette formation de nanofibres est ainsi basée sur l'étirement uni-axial d'une solution viscoélastique (108).

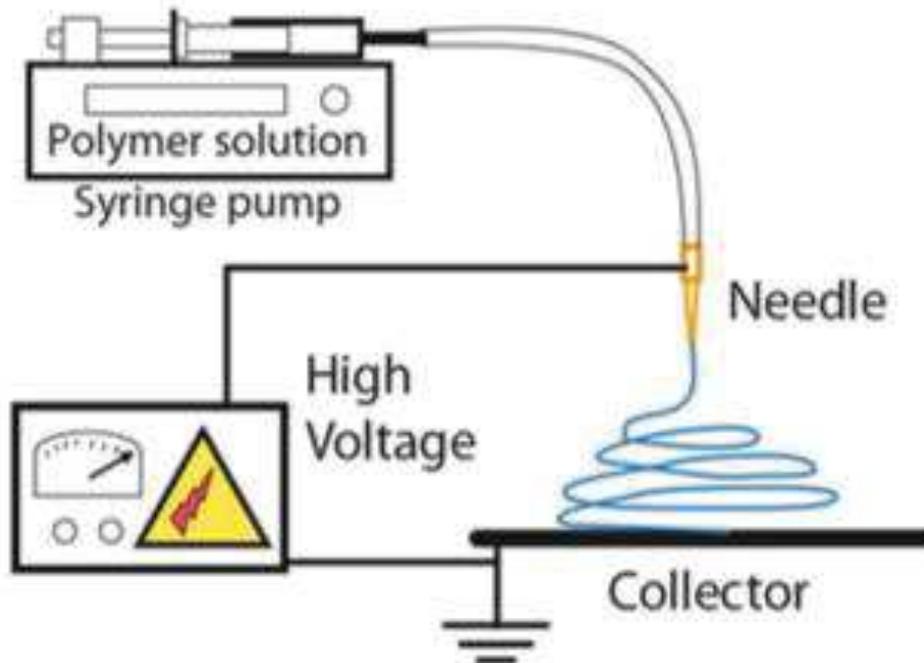


Figure 82 : schéma explicatif de l'électrofilage d'après : Lavielle, N. Fabrication de nanofibres et nanoparticules de polyesters pour la libération contrôlée d'un composé modèle, thèse de l'université de Strasbourg. 161 (2013)



Figure 83 : illustration des appareils d'électrofilage utilisés pour nos travaux à gauche et d'un dépôt de membrane à droite

La technique d'électrofilage permet d'obtenir des architectures fibrillaires tridimensionnelles. Par ailleurs, le procédé est simple, peu coûteux, permet de faire varier à souhait la composition des polymères et solvants. Les biomatériaux à porosité modulable susceptibles d'être produits par électrofilage trouvent un intérêt particulier dans des applications médicales comme la médecine régénérative (peau, cartilage, ligament...) et l'ingénierie tissulaire. On considère que ces architectures permettent l'organisation, la prolifération et la différenciation cellulaire

nécessaire à la restauration d'un tissu fonctionnel. Il est aussi admis que le rapport surface/volume élevé des constructions effectuées par électrofilage est particulièrement favorable à l'adsorption de protéines et à l'adhésion cellulaire. Finalement, les membranes produites présentent une architecture qui rappelle clairement celle du noyau de fibrine du PRF étudié précédemment (figure 84).

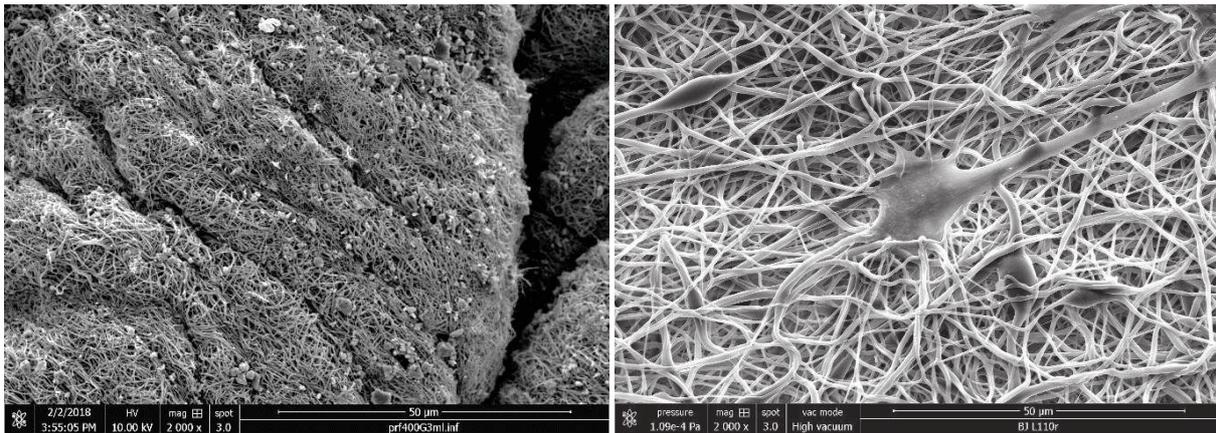


Figure 84 : micrographie en MEB. Aspect de la trame de fibrine d'une membrane PRF à gauche ; membrane de TPU électrofilé à droite

La morphologie des fibres dépendra du solvant et surtout de sa capacité à s'évaporer. En effet, si l'évaporation est rapide, l'aiguille risque d'être bloquée et si elle s'évapore faiblement, le solvant pourrait atteindre le collecteur et solubiliser la fibre.

L'autre paramètre qui déterminera l'efficacité de l'électrofilage est le produit de la viscosité intrinsèque de la solution de polymère avec la concentration  $[\eta] \cdot C$  (figure 85). La valeur obtenue dépend du poids moléculaire. S'il existe un réseau de polymères interpénétrés, la solution pourra alors former des fibres.

- Si  $[\eta] \cdot C > 9$  (partie 4), il n'y a pas d'électrofilage car la solution est trop visqueuse,
- Si  $[\eta] \cdot C > 5$  (partie 3), les fibres auront une bonne forme,
- si  $[\eta] \cdot C < 4$  (partie 2), on observe des instabilités le long des fibres, il y a formation de billes,

- si  $[\eta]*C$  devient trop bas (partie 1), la fibre entre les billes se casse car il n'y a plus d'interpénétration et le processus devient électropulvérisé, la solution n'est pas assez visqueuse.

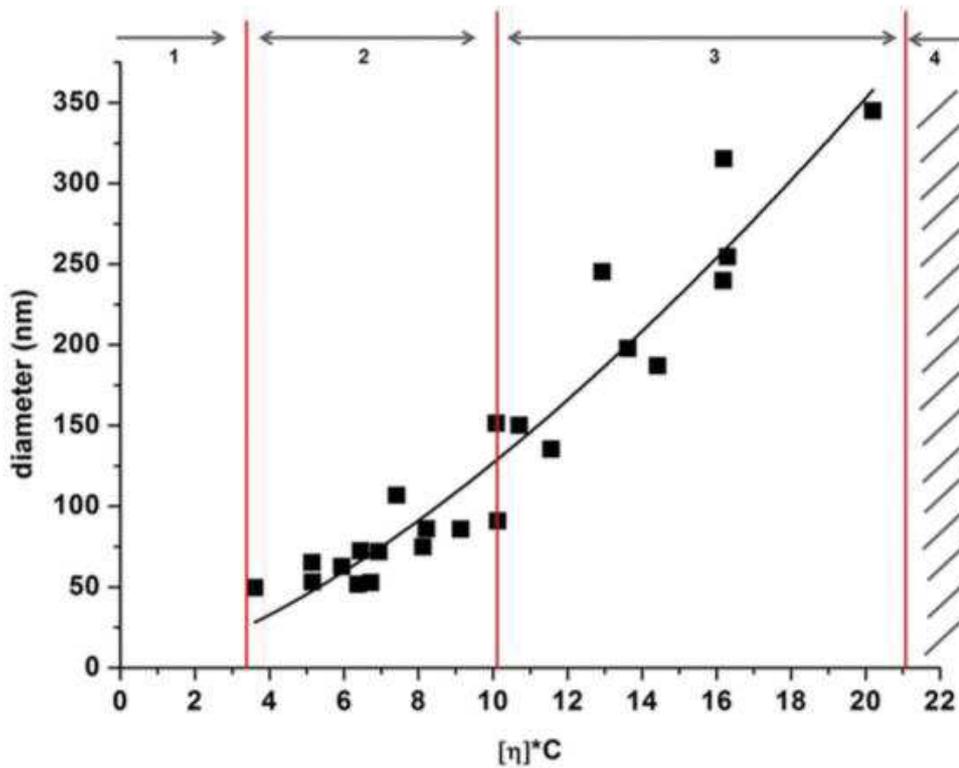


Figure 85 : schéma représentant l'aspect des fibres obtenues selon le produit entre viscosité et concentration de la solution ; d'après Lavielle et al (109)

Retenons toutefois que l'électropulvérisation (electrospraying) peut être intéressante pour certaines applications en combinaison avec l'électrofilage. Par exemple, ce processus peut augmenter la porosité d'une membrane en mettant des particules entre les fibres ou pour l'encapsulation de particules.

## b) Protocoles de fabrication des membranes électrofilées

Trois appareils d'électrofilage auront été utilisés au cours des travaux de Mr Migneret :

- ES1, permettant un électrofilage vertical,
- ES3, permettant un électrofilage horizontal combiné à une rotation verticale du collecteur
- ES4, le plus avancé des trois dispositifs, permettant un électrofilage vertical constant : la rotation horizontale du collecteur et le déplacement horizontal de l'aiguille permet de réaliser des membranes de grande surface homogènes en épaisseur. Il est également possible d'utiliser une autre aiguille sous le mandrin pour la pulvérisation électrolytique.

### Rôle des solvants de solubilisation et de la concentration en TPU

Le TPU utilisé lors de nos travaux préliminaires était le Desmopan 192<sup>®</sup>, fourni par Covestro. Ce matériau ne convient pas à une application médicale, mais les propriétés mécaniques de ce TPU sont proches du futur matériau biocompatible qui sera utilisé. Selon le prestataire, l'allongement à la rupture est d'environ 600% et le module de Young est d'environ 9 MPa.

Le TPU à l'achat se présente sous forme de granules (figure 86).



Figure 86 : photographie de granules de TPU à l'état brut

Celles-ci seront solubilisées dans un mélange N, N-Diméthylformamide (DMF) et Tétrahydrofurane (THF) (dans un rapport 7 : 3) qui s'est révélé être le mélange le plus efficace.

Le DMF est le solvant le plus efficace permettant 100 % de solubilisation à 24 heures mais c'est aussi le solvant ayant la température de solubilisation la plus élevée (153 °C) avec de ce fait, un risque important de persistance de solvant à l'arrivée du fil sur le collecteur ; or l'un des principes de l'électrofilage est basé sur l'évaporation du solvant entre l'aiguille et le support. Il est donc intéressant de mélanger le DMF à du THF, moins efficace, mais qui a une température d'évaporation plus basse (66 °C). Plus la proportion de DMF est élevée, plus il sera difficile au solvant de s'évaporer avant le support. À 100 % de DMF, le solvant atteint le support et solubilise les fibres en surface. Après plusieurs essais, le rapport 7: 3 en faveur du DMF a été choisi, les fibres ayant une bonne forme (pas de solubilisation des fibres en surface) et la membrane étant plus facile à manipuler.

D'autres solvants ont été testés comme le chloroforme ou le dichlorométhane avec des résultats moins satisfaisants en terme de solubilisation et de qualité de fil.

La concentration en TPU influencera elle, la forme des nanofilaments obtenus (figure 87) :

- A une concentration de 10 % en TPU, la viscosité est trop grande et des « granules » se forment le long des nanofilaments très fins
- A 15 % puis 20 %, les nanofilaments sont homogènes et de calibres croissants puisqu'il y a finalement plus de TPU une fois le solvant évaporé.

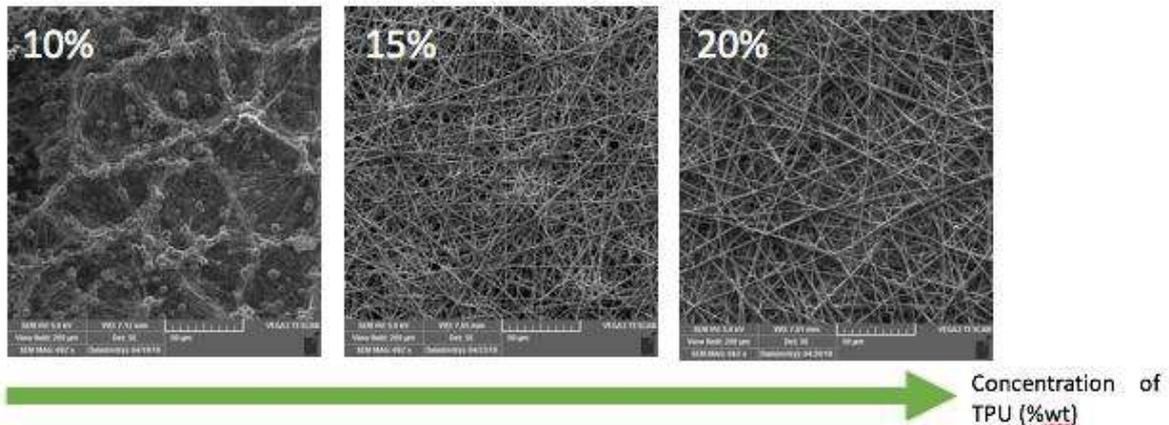


Figure 87 : micrographie en MEB. Influence de la concentration de la solution sur l'aspect des fibres obtenues, d'après R Migneret

### Rôle de la distance fil – collecteur

La distance entre l'aiguille et le support est un paramètre qui s'est avéré important : plus la distance est grande et plus le temps de la solution en mouvement est élevé permettant une évaporation du solvant. Par conséquent, le fait d'approcher les aiguilles du support augmente la quantité de solvant parvenant au collecteur.

Ce paramètre est relativement simple à analyser en MEB (figure 88) :

- Avec une distance de 10 cm entre aiguille et collecteur, du solvant persiste et les nanofilaments sont partiellement solubilisés et donc mal différenciés
- Avec 15 puis 20 cm, le solvant est évaporé, les nanofilaments bien dessinés, distincts les uns des autres.

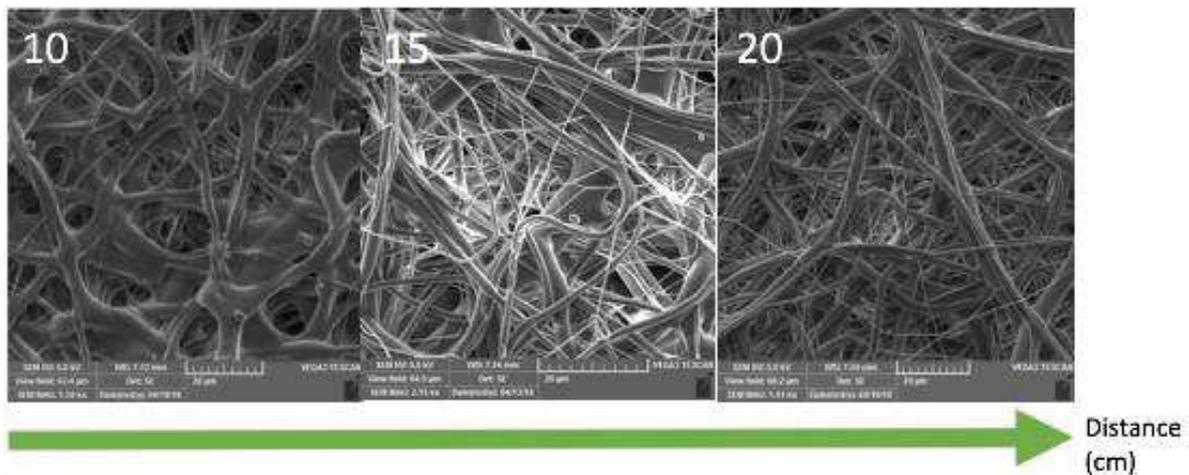


Figure 88 : micrographie en MEB. Influence de la distance entre le support de membrane et l'aiguille

### Influence du débit appliqué à la solution de TPU

L'influence du débit suit la même logique. Sans modifier la distance aiguille – collecteur ni la concentration de la solution de TPU, l'augmentation de débit suppose une plus grande quantité de solution délivrée par unité de temps et ainsi moins de possibilité pour le solvant de s'évaporer. Ce paramètre se révèle important pour faire varier l'architecture de la membrane dans son épaisseur comme souhaité (figure 89). En effet, avec un débit de délivrance de 4 ml/h, le TPU est totalement solubilisé à l'arrivée sur le collecteur donnant un aspect de membrane « lisse ». A un débit de 1 ml/h, nous obtenons des nanofilaments parfaitement dessinés sur le collecteur

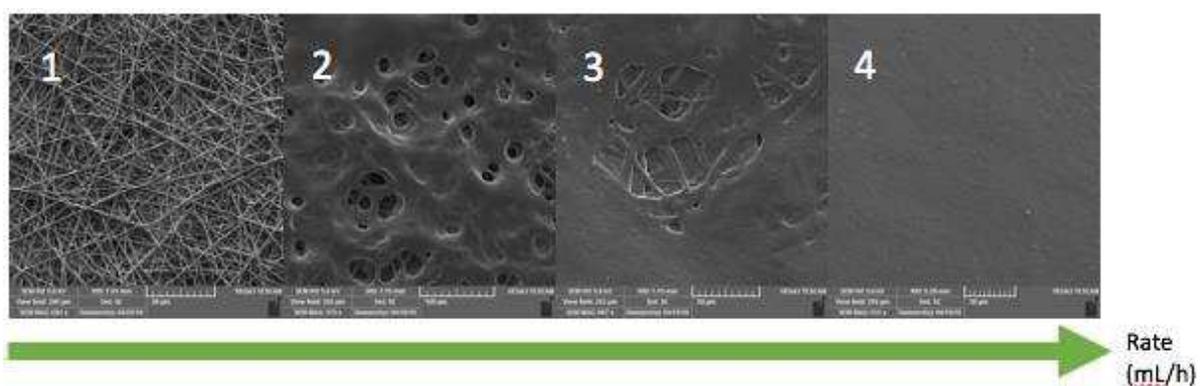


Figure 89 : micrographie en MEB. Influence du débit de distribution du nanofilament

### Synthèse des différents paramètres

Ces différentes analyses ont permis de définir les paramètres de référence de synthèse d'une membrane TPU électrofilée satisfaisante :

- Proportion des solvants : DMF / THF = 7 :3
- Concentration en TPU dans la solution : 20 %
- Distance aiguille – collecteur : 15 cm
- Débit de délivrance de la solution : 1 ml/h

#### **c) Obtention d'une membrane biface**

L'un des objectifs du cahier des charges de cette membrane était d'obtenir une membrane biface afin de différencier les réponses tissulaires obtenues sur le versant thoracique (face texturée en vue d'une bonne colonisation) de celles obtenues sur le versant abdominal (face lisse en vue de minimiser la colonisation) se basant sur les analyses d'explants de e-PTFE.

Plusieurs approches ont été testées :

- Réalisation d'un film plein par évaporation du solvant d'une solution de TPU dans un récipient (figure 90). Après évaporation complète, une membrane d'environ 100 µm est obtenue sur laquelle il n'y a plus qu'à électrofiler un maillage pour obtenir la face texturée (figure 91)
- Créer séparément une membrane et un film : obtenir le film à la température de fusion et appliquer rapidement la membrane avec une certaine pression. Différentes expériences ont été menées pour trouver une température qui ne ferait pas trop fondre le film, mais suffisante pour garantir la fusion des fibres et du film. La température conseillée pour l'injection est d'environ 210 à 225 °C. le principal problème lié à cette technique est la délamination entre les 2 couches (figure 92).

- L'électrofilage en un temps en faisant varier en cours de manipulation, les débits (figure 93).

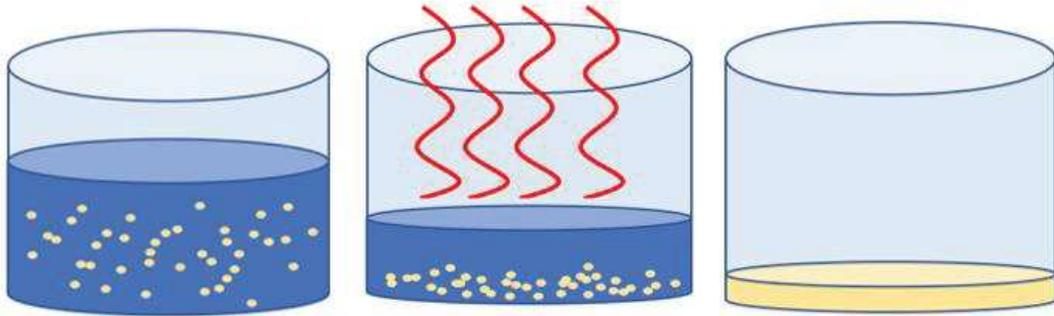


Figure 90 : schémas illustrant la réalisation du film plein par évaporation



Figure 91 : photographie d'un films obtenus par évaporation



Figure 92 : exemple de délamination entre membrane et film

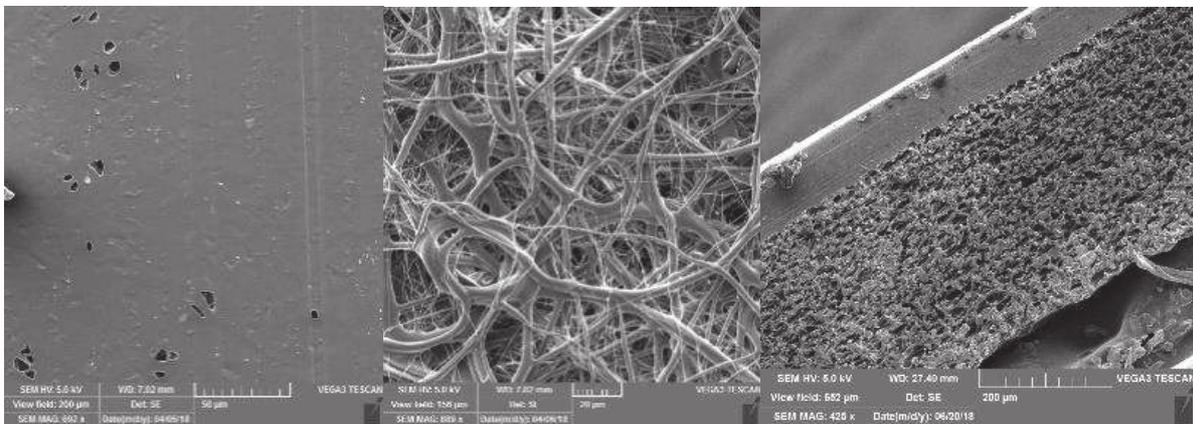


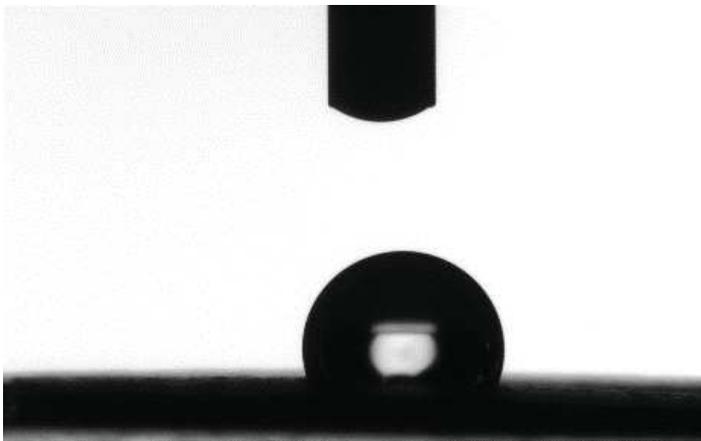
Figure 93 : micrographie en MEB d'une membrane biface obtenue en faisant varier les paramètres d'électrofilage en court de synthèse. De Gauche à droite : face lisse, face texturée, coupe transversale

C'est finalement cette dernière approche qui fut la plus prometteuse. L'idée est de commencer la manipulation par des « mauvais paramétrages » induisant la synthèse d'un film puis d'évoluer vers des paramètres de références induisant un maillage recouvrant peu à peu le film. Plusieurs types de membranes seront synthétisés selon ce procédé en faisant varier légèrement certains paramètres comme la concentration en polymère afin d'obtenir des membranes aux caractéristiques légèrement différentes : variation modérée de l'épaisseur globale de la membrane, variation du diamètre du nanofilament électrofilé.

#### **d) Données mécanistiques des membranes de TPU bifaces**

##### **i) Mesure de l'angle de contact**

La mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur les membranes TPU démontre leur caractère hydrophobe, d'une valeur de  $103^\circ$  soit proche de la valeur obtenue avec le e-PTFE dualmesh qui fait référence dans nos travaux (figure 94).



*Figure 94 : illustration d'une mesure d'angle de contact sur TPU*

##### **ii) Test de traction uniaxiale**

Ces tests ont été réalisés au laboratoire iCube reprenant exactement les mêmes conditions que pour les tests réalisés sur le e-PTFE, avec les mêmes calibrages des éprouvettes. Le but était de caractériser mécaniquement différentes membranes afin de déterminer les paramètres d'électrofilage les plus efficaces d'un point de vue mécanistique.

La mesure précise de l'épaisseur des membranes est l'une des étapes les plus importantes dans les essais de traction. Pour ce faire, un rhéomètre a été utilisé ; la procédure consistait simplement à commencer à un intervalle de  $1000\ \mu\text{m}$  puis à descendre très lentement jusqu'à

ce qu'une force axiale supérieure à 0,1 N soit détectée. À ce moment, l'épaisseur de la membrane a été considéré comme atteinte.

Voici les courbes obtenues pour 4 types d'échantillons ainsi que leurs caractéristiques (figure 95 et tableau 3) :

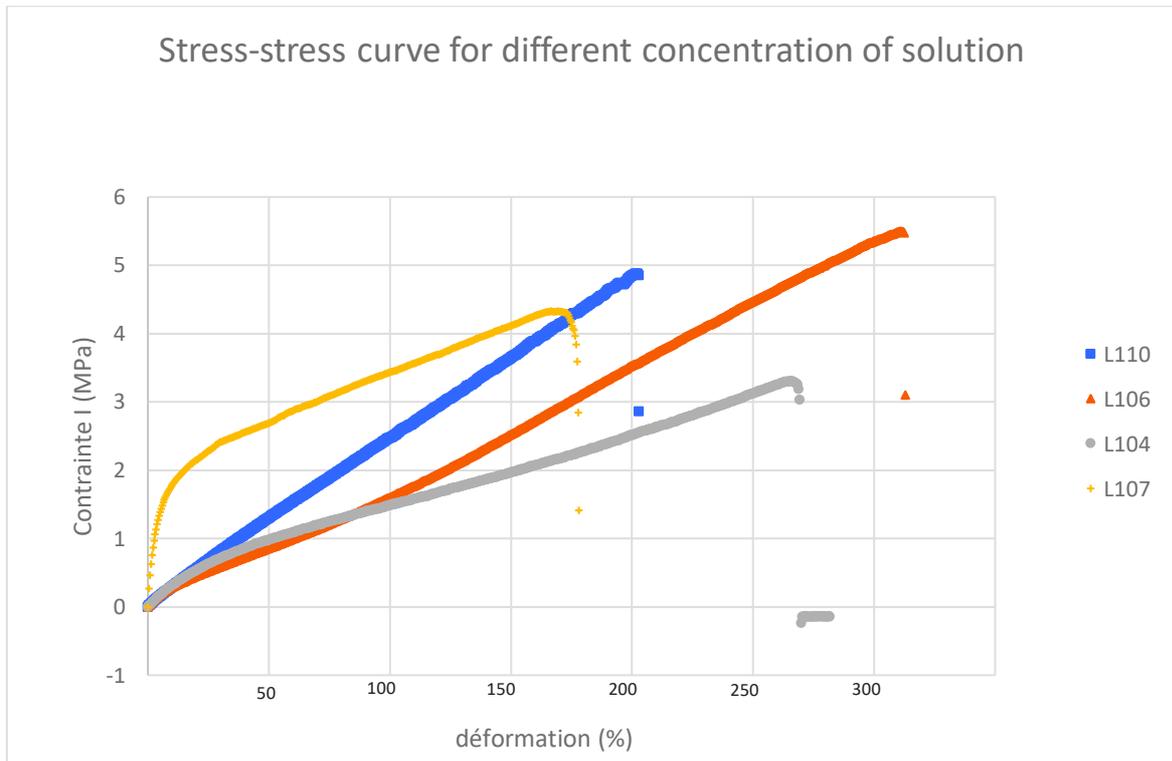


Figure 95 : courbes de contrainte/déformation ingénieur obtenues sur différentes membranes TPU

Membrane	Concentration en TPU (%wt)	Épaisseur de membrane ( $\mu\text{m}$ )
L104 (n=5)	20	87
L106 (n=5)	15	60
L107 (n=5)	20 (fonctionnalisée à l'acide tanique)	66
L110 (n=5)	12	54

Tableau III : paramètres de synthèse des membranes de TPU testées

La comparaison de ces quelques membranes nous donne déjà des réponses :

- Une étirabilité de l'ordre de 300% pour la majorité des membranes.
- Plus la concentration en TPU est élevée, plus le module est élevé et moins le comportement du matériau est élastique.
- Plus le diamètre moyen est faible, ce qui est proportionnel à la concentration de la solution et plus la contrainte augmente avec la déformation.
- En ce qui concerne la membrane L107, elle est constituée d'acide tannique, son comportement est beaucoup plus plastique que celui des autres membranes et l'allongement à la rupture est plus faible. Ces données sont objectivées à la simple manipulation de la membrane qui semble très plastique et se rompt « au froissement ».

### **iii) Test de traction sous MEB**

Comme pour le e-PTFE, nous avons voulu évaluer le comportement des membranes lors des essais de traction uniaxiale par des tests sous MEB. Afin de ne pas avoir à métalliser les éprouvettes de traction, nous ferons les analyses en mode « low vacuum » (vide partiel).

Nous avons testé 2 types de membranes bifaces : une membrane avec des nanofilaments de petit calibre (L110, figure 96) et une de nanofilaments de gros calibre (L116). La préparation des éprouvettes suivait le même protocole que pour les tests de traction du e-PTFE sous MEB.

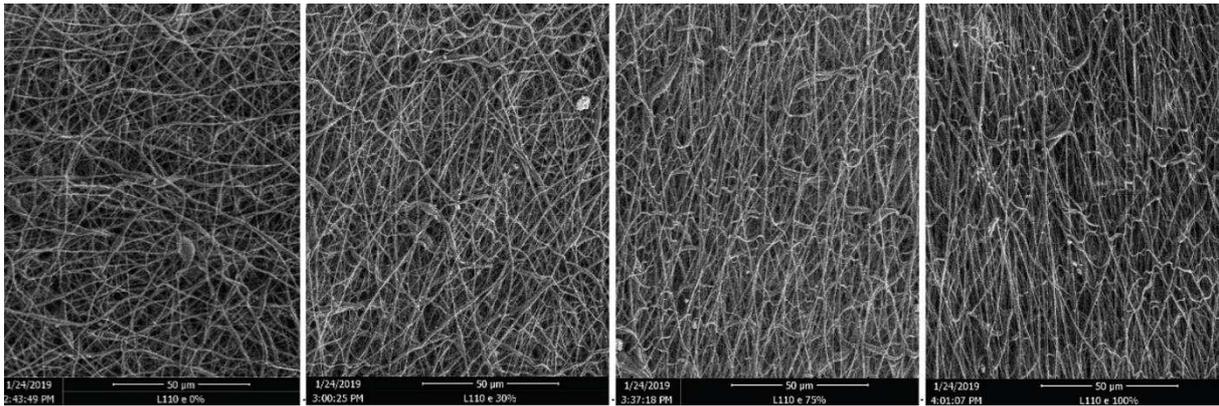


Figure 96 : micrographie en MEB (low vacuum x 1000) sur les membranes avec nanofilaments de petit calibre (L110) ; étirement exprimé en pourcentage de la longueur initiale (+ 0 %, + 30 %, + 75 %, + 100 % de gauche à droite)

Dès 30% d'étirement, on constate un parallélisme des nanofilaments selon l'axe d'étirement et un effet de flambement pour les nanofibres orientées perpendiculairement à la sollicitation mécanique (figure 97). A aucun moment nous n'avons constaté de rupture de nanofilament et ce jusqu'à 300% d'étirement.

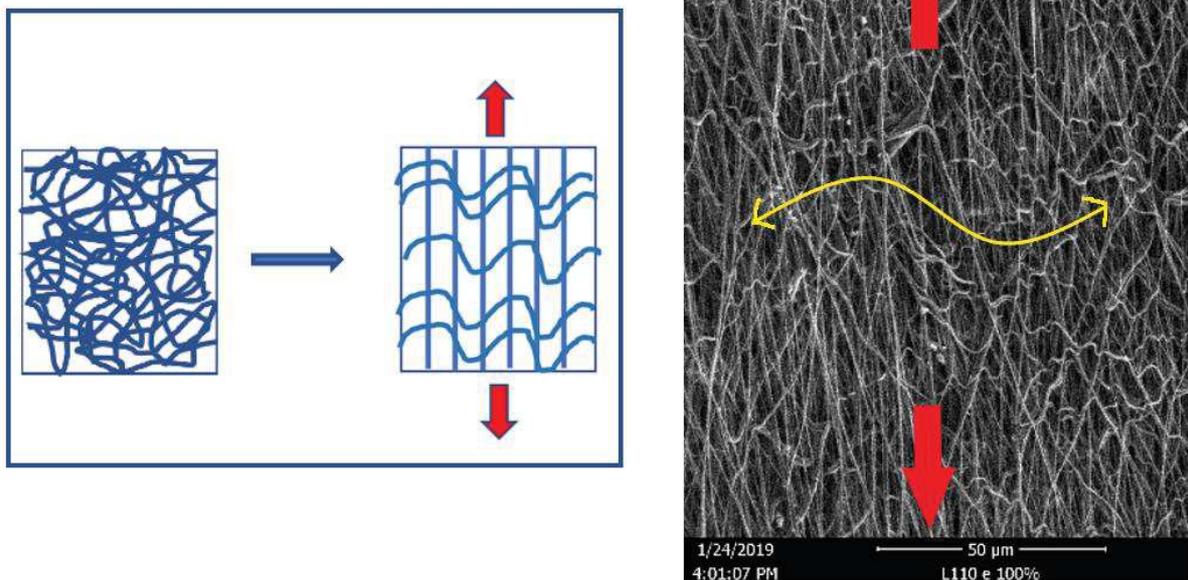


Figure 97 : illustration de la déformation des nanofilaments sous l'effet d'une traction uniaxiale à droite et aspect correspondant en observation MEB. Parallélisme des nanofilaments selon l'axe de traction (flèches rouges) et effet de flambement perpendiculaire (double flèche jaune)

Si l'on compare 2 prototypes de membranes se différenciant par le calibre des nanofilaments, nous obtenons des données comparables, à savoir, étirement selon l'axe de traction, flambement transversal, absence de rupture (figure 98).

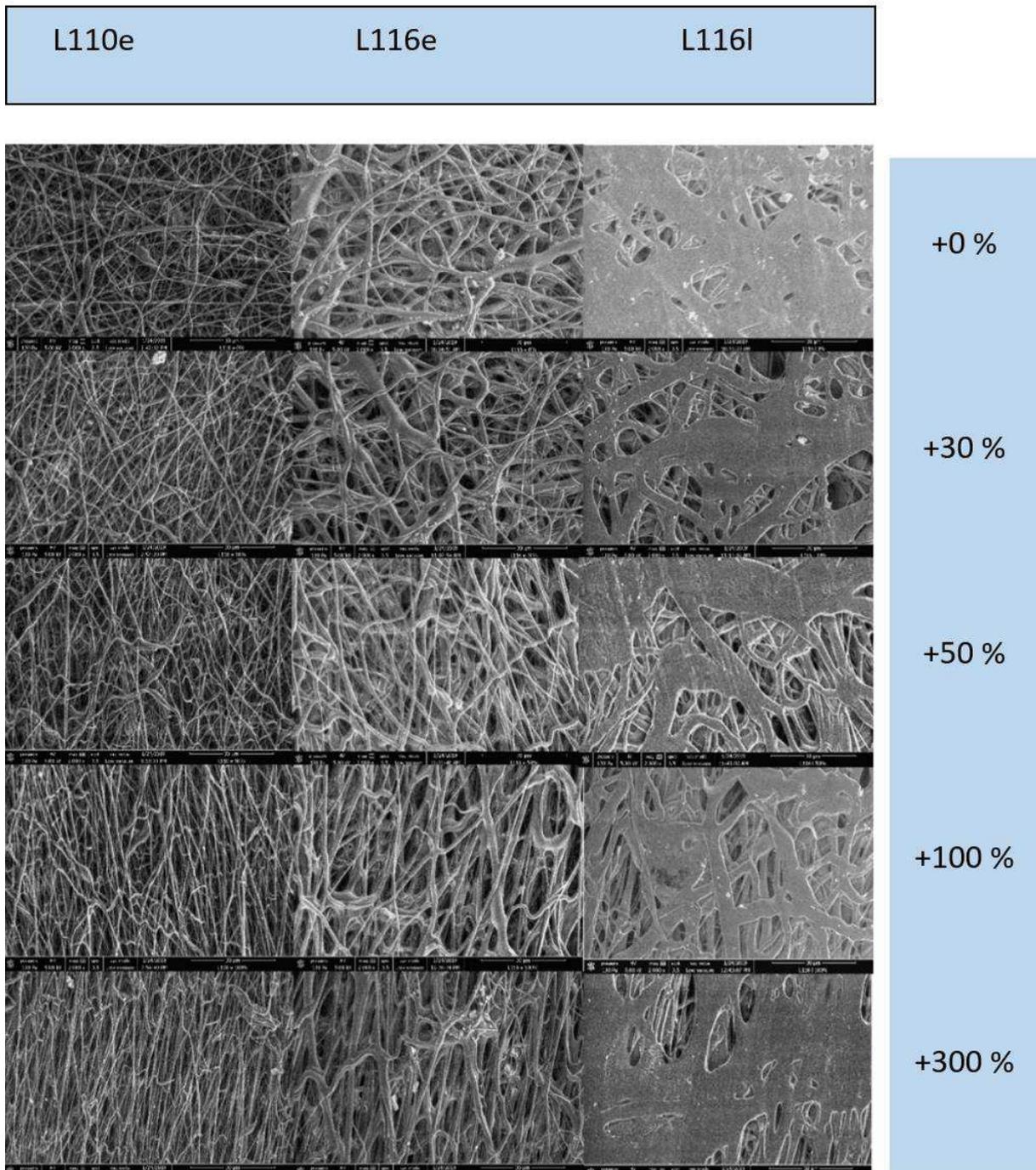


Figure 98 : micrographie en MEB. Etirement des membranes de TPU en pourcentage de la longueur initiale. L110e : membrane à nanofilaments fins ; versant texturé, L116e : membrane à nanofilaments larges ; versant texturé, L116l : membrane à nanofilaments larges ; versant lisse

Ce que l'on peut remarquer de particulier :

1. Lorsque l'on relâche la traction, la membrane ne revient pas à la taille et forme initiale bien que l'aspect microscopique soit inchangé (figure 99 et 100). Il y a donc une part de déformation plastique avec acquisition d'un allongement permanent : nous observons donc un phénomène de fluage de notre matériau dans ces conditions expérimentales.

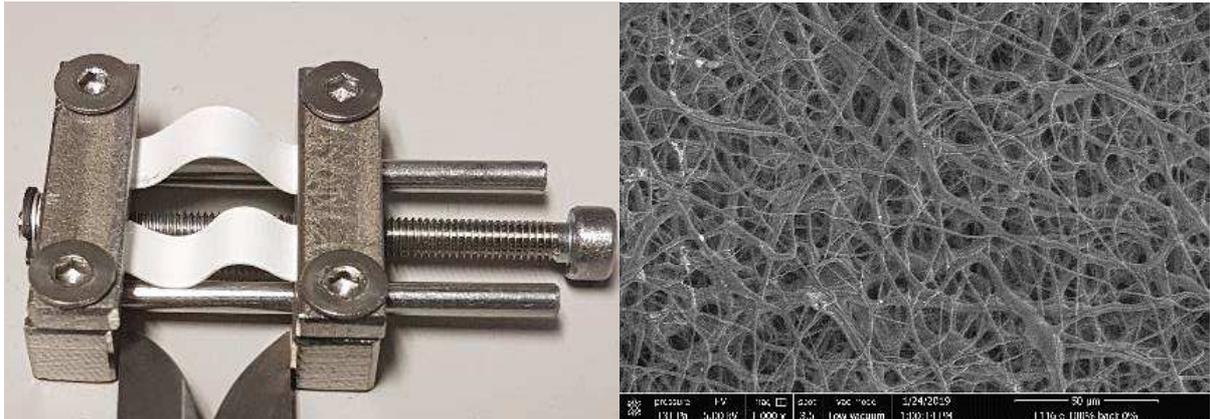


Figure 99 : illustration de l'analyse des membranes au repos, après un étirement de 100 % : photographie de la membrane sur l'appareil à traction et micrographie en MEB, x 1000



Figure 100 : photographie montrant l'aspect des membranes au repos, après un étirement de 400 %

2. Nous remarquons également que, sur la face dite lisse, il existe encore de nombreuses imperfections qui sont le siège d'un étirement linéaire. Il n'y a là encore pas de rupture, mais l'étirement linéaire semble variable en fonction de l'uniformité de la surface (figure 101) : les zones où l'électrofilage est visible augmentent leur surface sous la contrainte d'étirement. Sans que nous ayons pu le démontrer, il semble que cela soit particulièrement vrai là où l'épaisseur de membrane lisse est particulièrement faible.

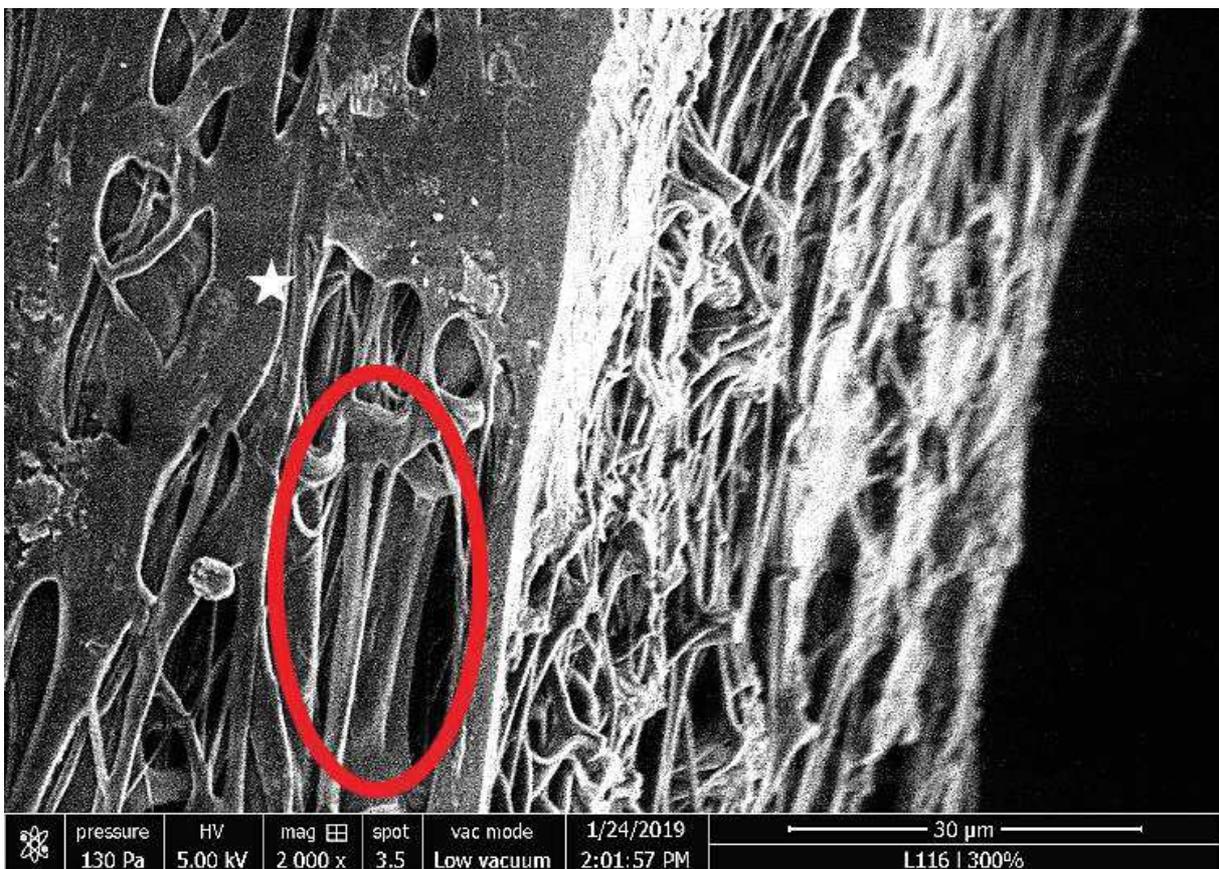


Figure 101 : micrographie en MEB. Coupe transversale de la membrane L116 sous 300 % d'étirement, face lisse en surface (étoile). Les zones où l'électrofilage est visible augmentent leur surface sous la contrainte d'étirement (rond rouge)

Les premiers résultats obtenus semblent encourageants puisque l'on obtient une bonne étirabilité sans rupture, au-delà de ce que l'on a pu observer avec le e-PTFE. Cependant, un certain degré d'allongement plastique s'observe au-delà de 100 % d'étirement : à 100 % d'étirement, la membrane gagne 20 % d'allongement, alors qu'à 300 %, on observe jusqu'à

240 % d'allongement plastique ! Cela peut poser question quand à la contrainte mécanique que supportent nos membranes, en particulier, les contraintes ventilatoires qui sollicitent les membranes par des efforts d'étirement-relâchement permanents. Toutefois, ces sollicitations mécaniques se font avec une cinétique toute autre, à savoir, un allongement bien moindre par unité de temps, des efforts de tension multidirectionnelle et non uniaxiale, ce qui suppose une sollicitation différente des nanofilaments mais dans tous les cas, des résultats supérieurs à ceux obtenus avec la membrane de e-PTFE.

Nous souhaitons compléter nos tests par des tests de gonflement et une collaboraiton est en cours afin de mettre en place ces tests prochainement.

#### **iv) AFM**

La détermination des modules élastiques a été réalisée par la technique de nanoindentation en AFM en utilisant un cantilever ayant une raideur de 0,06 N/m équipé d'une bille de borosilicate d'un diamètre de 10  $\mu\text{m}$ , en travaillant avec des vitesses d'approche et de retrait du cantilever de 5  $\mu\text{m/s}$  et en appliquant une force d'appui de 1 nN. Le module de Young (E) de notre membrane a été comparée à celui du e-PTFE non implanté (tableau 4).

	<b>e-PTFE Goretex® Dualmesh natif</b>	<b>TPU face lisse</b>	<b>TPU face texturée</b>
<b>Module de Young (kPa +/- ES ; n = 20)</b>	<b>295 ± 43,6</b>	<b>744 ± 136</b>	<b>298 ± 26,5</b>

Tableau IV : modules de Young obtenus sur le TPU et comparé au e-PTFE

Ainsi, nous obtenons en effet 2 surfaces aux propriétés mécaniques différentes : la face texturée présente un module d'élasticité comparable à celui du matériau référence alors que la face lisse présente un module bien plus élevé et ainsi, potentiellement moins « attirant » pour le tissu de colonisation.

## **e) Données biologiques**

### **i) Analyse de la viabilité cellulaire et des réactions immunologiques**

Selon la même démarche que pour le e-PTFE fonctionnalisé, nous avons voulu évaluer l'implantabilité de notre biomatériau selon le même protocole d'étude. Les protocoles de manipulations sont strictement identiques que ceux décrits pour les tests sur e-PTFE.

#### Mesure de l'activité mitochondriale (reflet de la viabilité cellulaire)

En ce qui concerne l'analyse de l'activité mitochondriale par MTS, nous ne notons aucune différence significative entre les puits témoins (cellules RAW 264.7) et les puits avec biomatériau, ni aucune différence selon la « face » d'exposition (figure 102). Ces résultats sont superposables à ceux obtenus avec le e-PTFE. Élément intéressant, la présence du TPU n'entraîne aucune modification morphologique des RAW 264.7 à l'inverse cette fois-ci de ce que nous avons pu observer avec le e-PTFE fonctionnalisé à la PDA (figure 103).

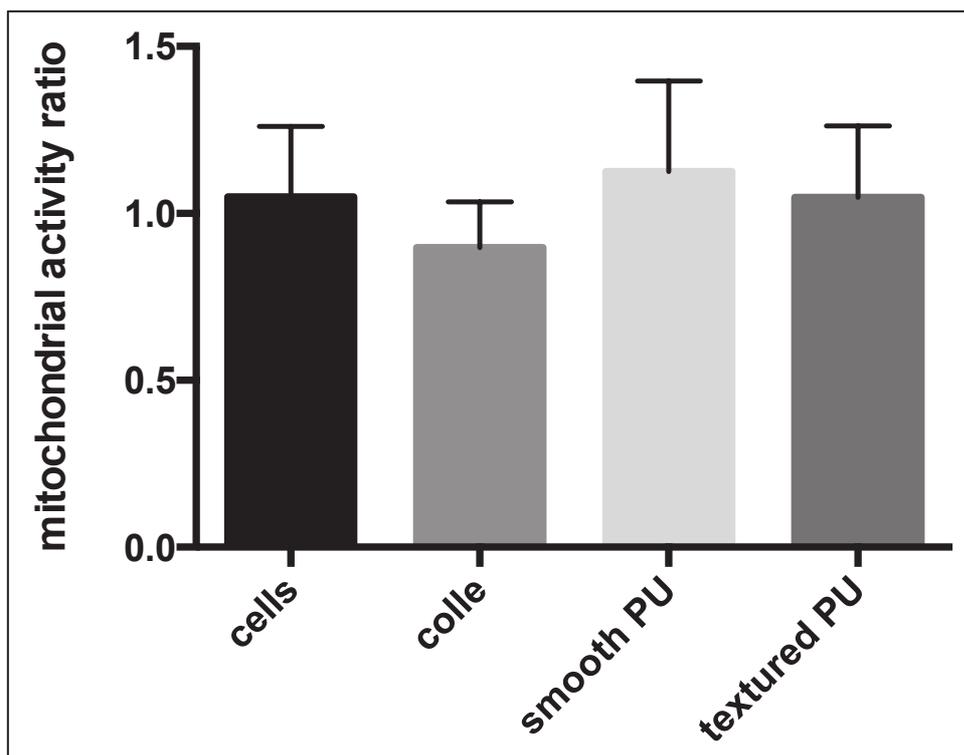


Figure 102 : analyse de l'activité mitochondriale en MTS (n = 2). Il n'y a pas de différence significative entre les puits contenant des cellules seules, la colle de maintien des membranes et le TPU. Cells : cellules seules ; colle : colle de maintien ; smooth PU : face lisse de nos membranes ; textured PU : face texturée de nos membranes

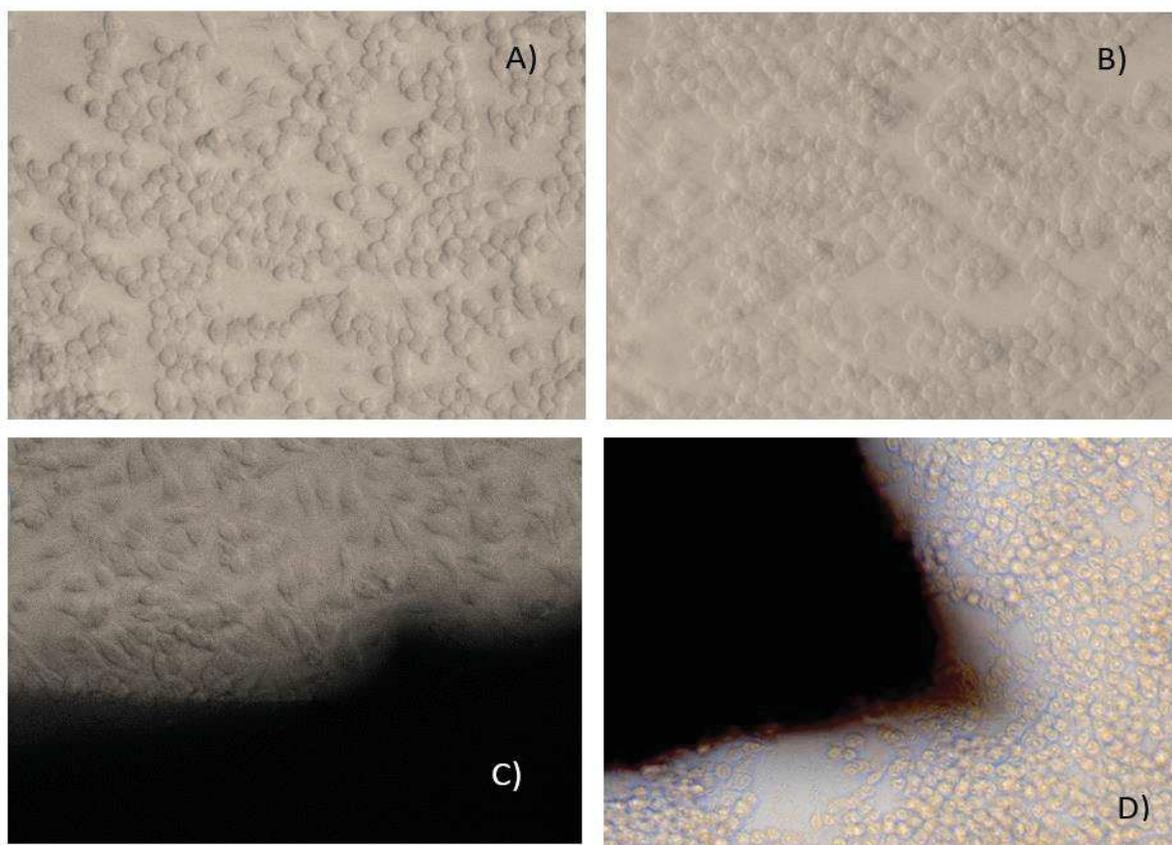


Figure 103 : analyse morphologique au microscope optique Leica x 40 des cellules RAW 264.7 en fonction de leurs conditions. A : cellules seules ; B : en présence de LPS (contrôle positif) ; C : en présence de e-PTFE PDA ; D : en présence de TPU

### Mesure du taux de production de Nitrite

L'analyse du taux de nitrite dans le surnageant ne montre là encore aucune modification significative témoignant indirectement de l'absence de cytotoxicité du TPU même si ce test est moins sensible qu'un test de détection de cytokine par méthode ELISA (figure 104). Néanmoins, ces premiers résultats sont encourageants quant à la poursuite de nos investigations sur le développement de ce nouveau biomatériau.

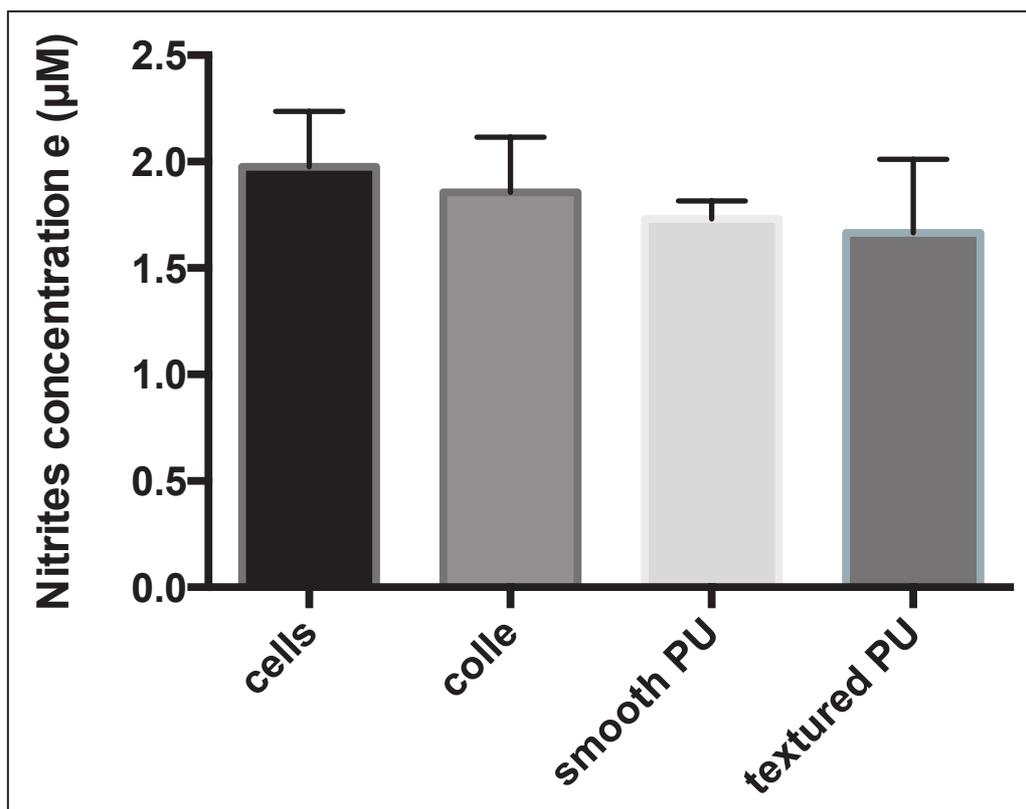


Figure 104 : dosage de nitrite dans le surnageant des cultures sur RAW 264.7. Nous ne notons aucune différence significative entre les différentes conditions testées. Cells : cellules seules ; colle : colle de maintien ; smooth TPU : face lisse de nos membranes ; textured PU : face texturée de nos membranes

## ii) Analyse de la réponse cellulaire in vitro

Nous avons réalisé diverses études de réponse cellulaire : certaines utilisant des cellules d'origine murine afin de pouvoir poursuivre éventuellement sur des études sur le petit animal et garder une cohérence d'analyse de résultats, d'autres sur des cellules de lignées humaines (fibroblastes et cellules musculaires striées) afin de se rapprocher de nos attentes cliniques.

## **(1) Evaluation *in vitro* sur des lignées cellulaires murines**

### Macrophages murins RAW 264.7

Nous avons préparé des disques de biomatériau de 1cm de diamètre à l'emporte-pièce. Ces disques ont été stérilisés par le système de stérilisation STERRAD® (Johnson & Johnson division ASP®) au pôle de pharmacie du CHU de Hautepierre afin de respecter le processus de stérilisation des instrumentations de chirurgie. Le procédé Sterrad® utilise comme agent stérilisant le peroxyde d'hydrogène, au cours d'un cycle comportant une phase plasma. Le cycle se déroule à basse température (50 °C) ; il permet de stériliser certains dispositifs médicaux thermosensibles. Ils seront placés au fond de puits d'une boîte 24 puits et maintenus au fond de ces puits par une bague en acier.

Les cellules sont des macrophages murins RAW 264.7 utilisés pour nos études de viabilité et toxicité cellulaire. Nous avons fait le choix d'une concentration de départ de  $1 \cdot 10^5$  cellules/puits dans 1 ml de milieu de culture (DMEM + 5 % SVF) dans des plaques 24 puits, dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé toutes les 48 heures et la culture est arrêtée au bout de 5 jours par fixation primaire dans une solution de glutaraldéhyde 4 % et paraformaldéhyde 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4).

### Cellules musculaires murines C2C12 (figure 105)

Les matériaux ont été préparés sous forme de pastilles de 3 mm de diamètre, stérilisés selon le procédé Sterrad® et collés au fond des puits, laissés séchés 24 heures au moins sous PSM. Les cellules C2C12 provenaient de 2 ampoules congelées du laboratoire 3bio de Mr Frisch. La différenciation des myoblastes en myotubes se fera dans 2 flasques, l'une pour l'ampoule passage 6 et l'autre pour l'ampoule passage 21. Les C2C12 (myoblastes murins, ATCC®) sont

mis en culture avec une concentration de  $5.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu de culture utilisé pour cette première phase de croissance était le Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI AQ Sigma®) additionné de 20 % de SVF, le tout placé en étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. A 48 heures, le milieu est remplacé par le milieu de différenciation, le RPMI AQ Sigma® avec cette fois-ci 5 % de sérum de cheval (Fischer®). Le milieu initial est rincé selon le protocole habituel, les cellules détachées par ajout de Trypsine EDTA. Cette étape impose des manipulations douces et l'absence d'agitation ou de choc afin d'éviter l'agglutination des cellules. Le milieu de différenciation est ensuite ajouté aux cellules et l'ensemencement peut enfin être fait sur les matériaux avec une concentration de  $1.10^6$  cellules/puits. Le tout est à nouveau placé en étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé toutes les 48 heures. Les cultures ont été stoppées à J1, J4, J7 afin de suivre le recouvrement cellulaire de nos membranes. La fixation et la préparation des échantillons était inchangée.

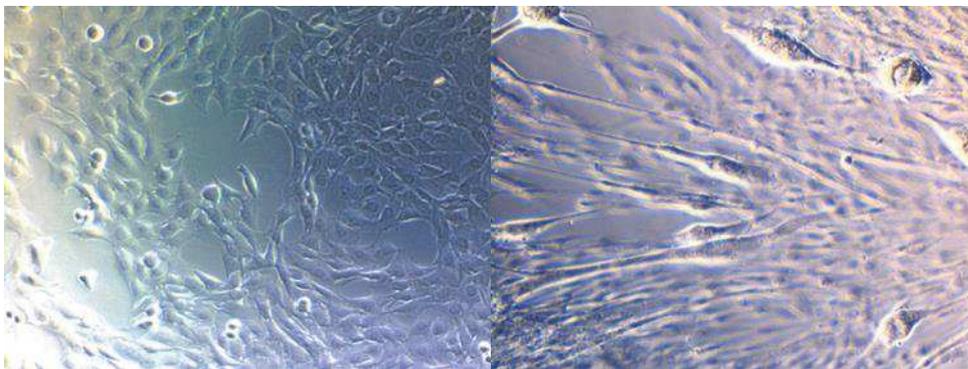


Figure 105 : aspect des cellules C2C12 en microscopie optique : à gauche, myoblastes avant différenciation ; à droite, aspect des myotubes après différenciation. (Leica x 40)

## Résultats

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les échantillons pour analyse au MET sont en cours d'inclusion et pourront être analysés prochainement. Toutefois, nous avons pu faire des analyses en MEB après métallisation. Quelque soit le type cellulaire utilisé, nous constatons

une bien meilleure interaction entre les cellules et les nanofilaments d'électrofilage. Les cellules s'étalent sur le support et « envoient » des pseudopodes dans toutes les directions (figure 106), prenant comme support, les nanofilaments de la prothèse. Cela encourage à une pénétration au sein du matériau et à une meilleure interconnexion entre les cellules.

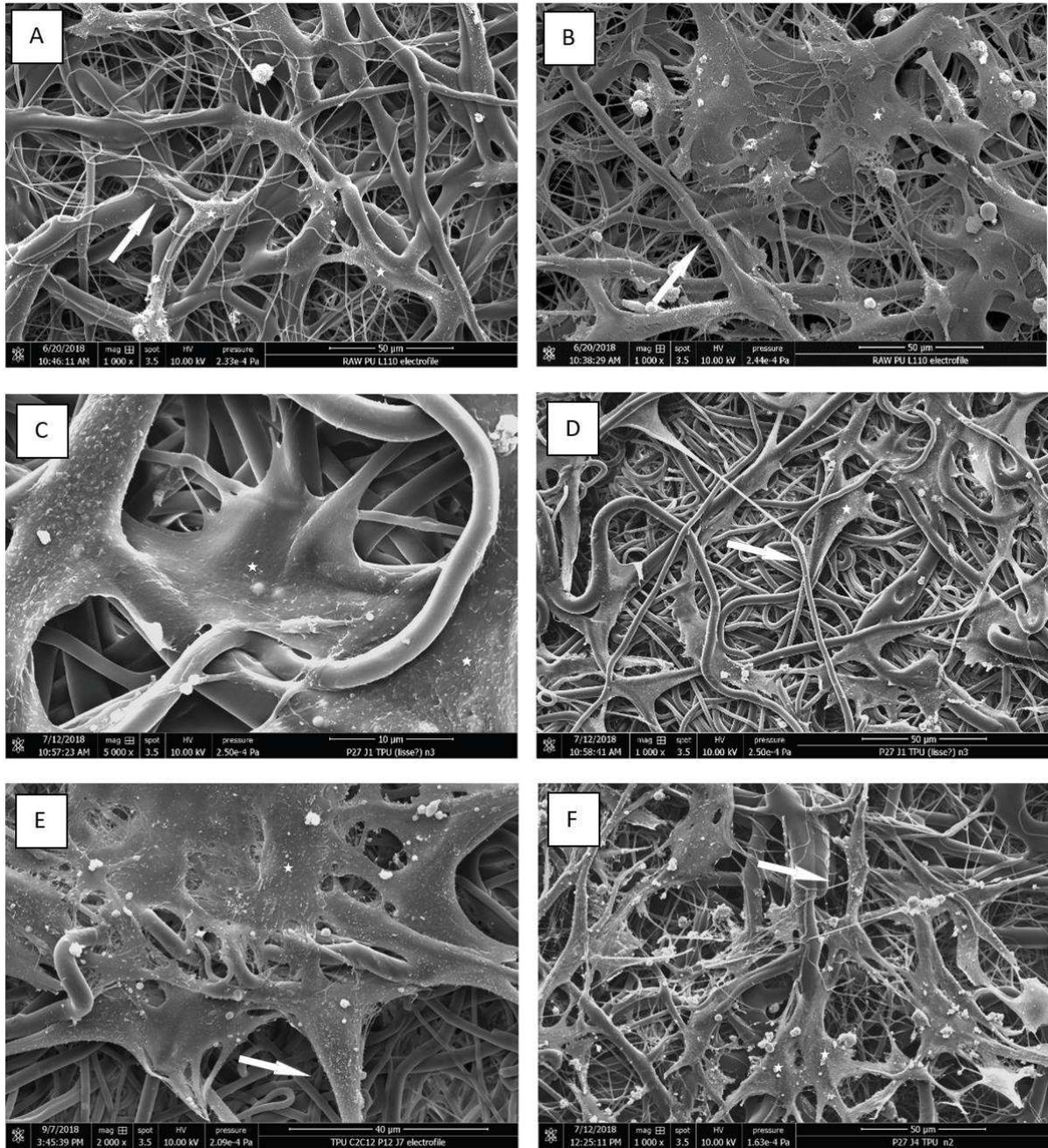


Figure 106 : micrographies en MEB. Cultures *in vitro* de macrophages murins (étoiles ; A et B) et de cellules musculaires murines (étoiles ; C à F). On remarque des cellules parfaitement étalées sur le support, dont les prolongements (flèches) suivent les nanofilaments et s'enchevêtrent avec. Ces prolongements facilitent l'interconnexion des cellules.

Par ailleurs, on constate avec les cultures de cellules musculaires que la colonisation est majeure dès le 4<sup>ème</sup> jour de culture, uniforme, orientée. A 7 jours, on constate une colonisation uniforme de notre membrane de TPU. Comparativement, la colonisation sur le e-PTFE semble bien moins dense et très irrégulière. De plus, les bandes rugueuses semblent faire barrière à une colonisation de proche en proche du matériau avec des prolongements cellulaires qui s'interrompent à la lisière de ces bandes, la surface devenant comme trop chaotique pour que les cellules y trouvent un point d'attache (figure 107).

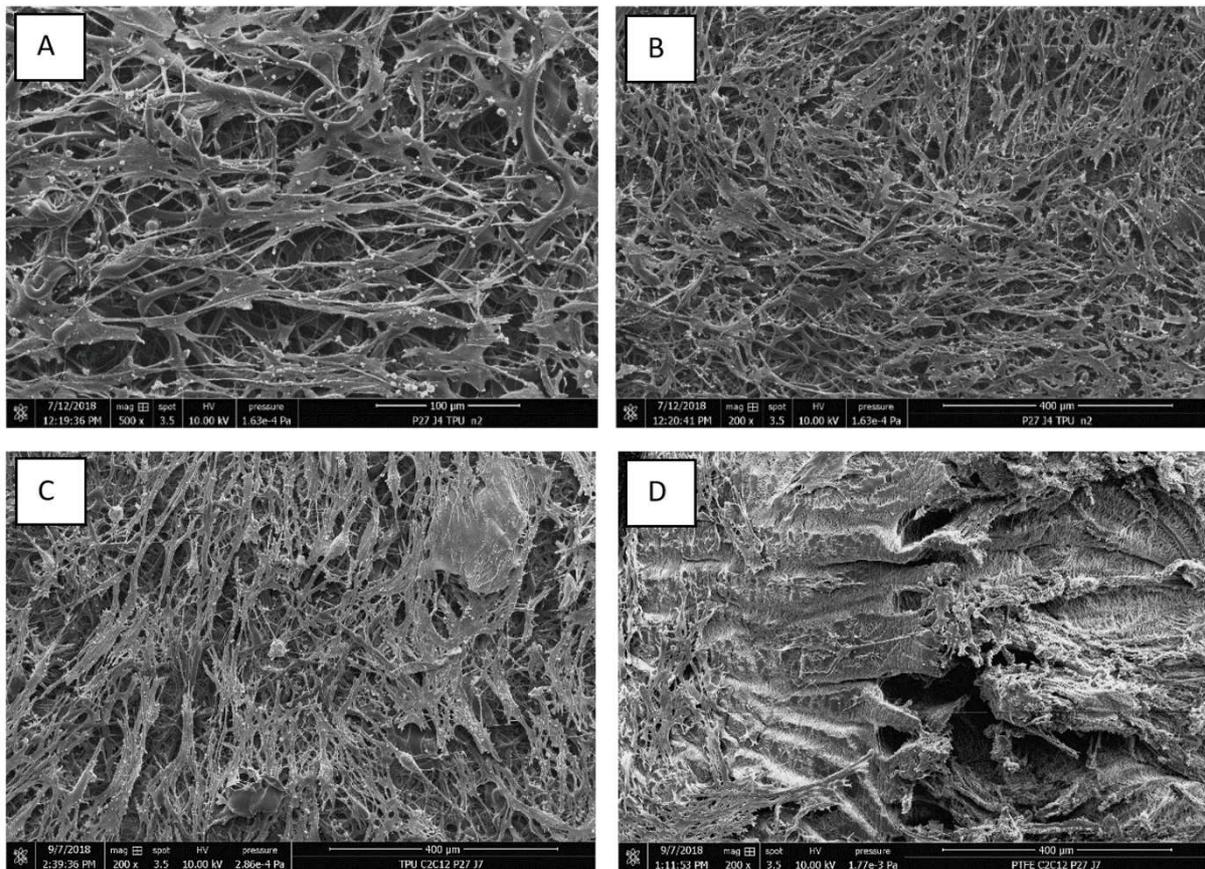


Figure 107 : micrographies en MEB. Nous constatons une colonisation diffuse, harmonieuse et orientée dès le 4eme jour de culture sur le TPU (A, B). Si l'on compare les observations entre TPU et e-PTFE, on constate une bien meilleure colonisation sur le TPU avec une colonisation anarchique et irrégulière sur le e-PTFE et surtout, l'impression d'une rupture de colonisation en lien avec les bandes rugueuses de la face rugueuse (C et D). les bandes rugueuses semblent faire barrière à une colonisation de proche en proche du matériau avec des prolongements cellulaires qui d'interrompent à la lisière de celles-ci puis une surface trop chaotique pour que les cellules y trouvent un point d'attache (D)

De plus, les cellules semblent moins « adhérentes » au e-PTFE qu'au TPU (figure 108).

D'une part les cellules ne colonisent que les bandes lisses, mais d'autre part, elles semblent comme « posées » à la surface du e-PTFE sans réellement pénétrer le matériau. On

observe d'ailleurs, un décollement beaucoup plus important du tapis cellulaire sur nos préparations avec e-PTFE que sur celles avec TPU (figure 109).

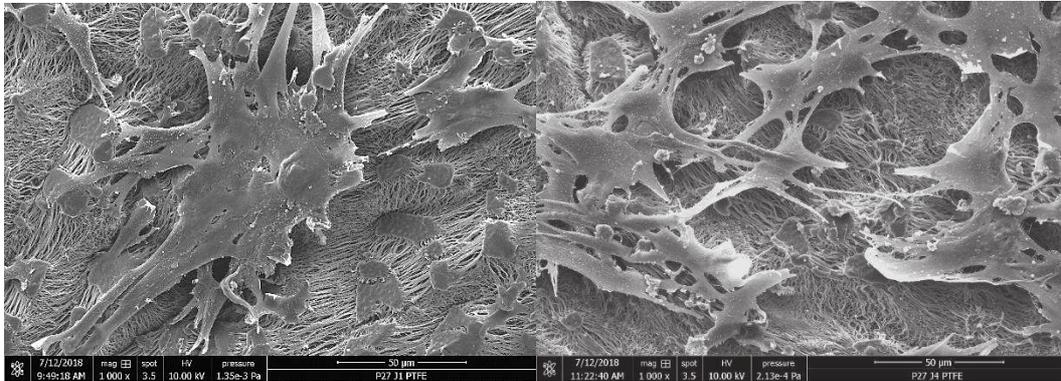


Figure 108 : micrographies en MEB. Les cellules semblent peu adhérentes au support e-PTFE

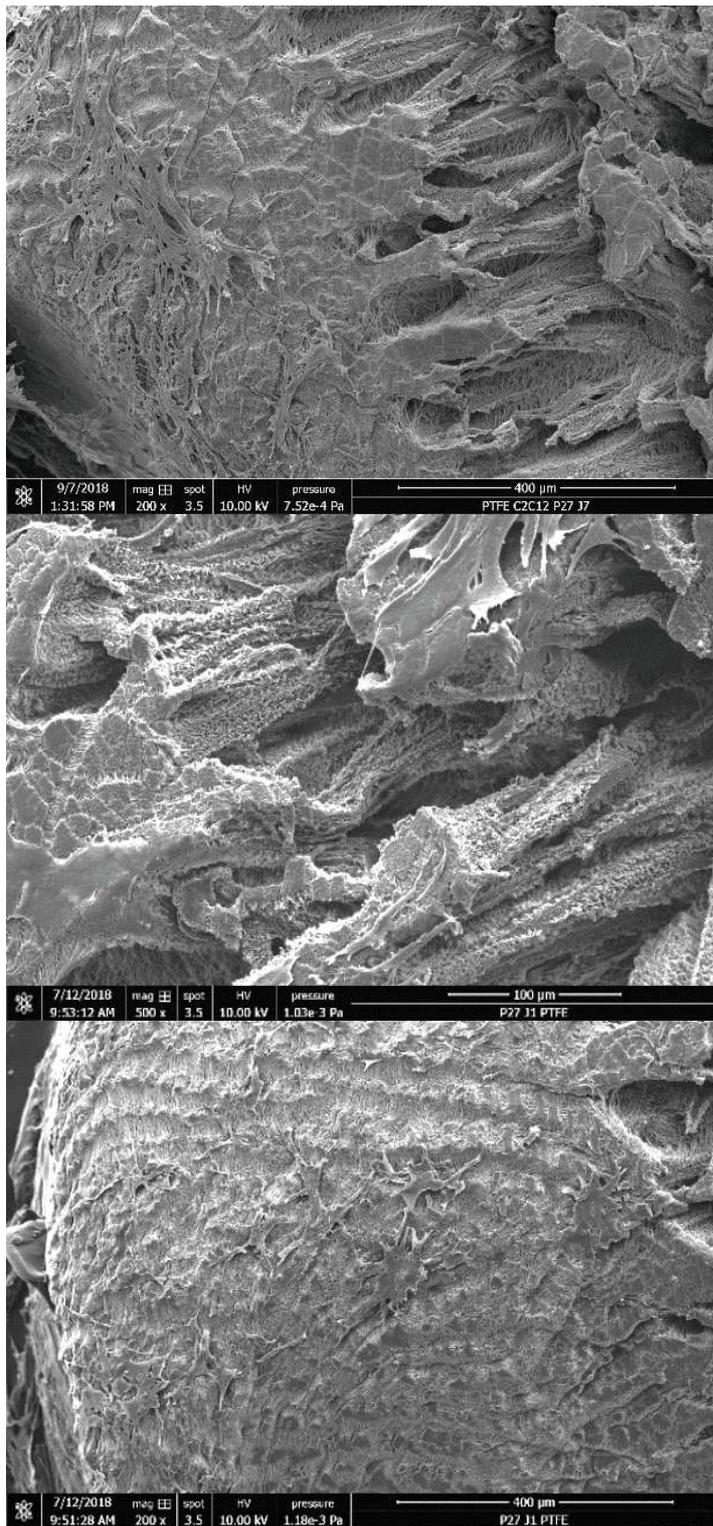


Figure 109 : micrographies en MEB. Les cellules vont certes « s'étaler » sur le support en e-PTFE mais semblent faiblement adhérentes, ont moins d'interconnexion entre elles, et ne semblent coloniser que les bandes lisses de la face rugueuse

Enfin, si l'on étudie la face lisse de nos membranes, on constate que les cellules développent moins de prolongements et donc moins d'interconnexion (figure 110). Elles semblent isolées les unes des autres. A noter, une face lisse encore assez imparfaite et méritant des travaux supplémentaires pour obtenir une membrane uniforme.

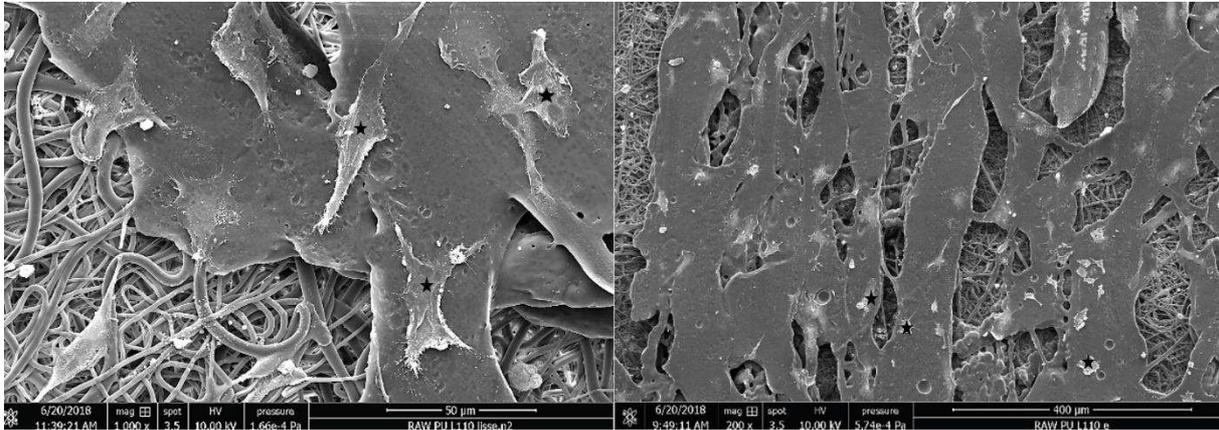


Figure 110 : micrographies en MEB. Aspect des cellules RAW 264.7 (étoiles) sur la face lisse du TPU ; les cellules sont moins étalées, sans réelles interconnexions entre elles

## (2) Evaluation *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines

Dans un second temps nous avons voulu nous assurer que les résultats obtenus avec des cellules murines était reproductibles avec des fibroblastes humains, premières cellules à intervenir sur des matériaux implantés en plus des cellules de l'immunité. Nous avons également prévu dans les prochaines étapes de nos travaux de travailler avec des cellules musculaires striées humaines que nous avons commandé et reçu récemment.

Les fibroblastes sont des fibroblastes humains BJ (ATCC® CRL-2522). Ces cellules sont amplifiées dans du milieu de culture DMEM supplémenté avec 10 % SVF, 1 % pénicilline/streptomycine/amphotéricine B et 1 % Glutamax® (v/v, Gibco) et placées dans une étuve thermostatée à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO<sub>2</sub> avec un changement de milieu tous les deux jours jusqu'à confluence.

L'ensemencement a lieu au 3<sup>ème</sup> passage et la concentration cellulaire est de  $5.10^4$  cellules/mL. Le milieu est changé toutes les 48H et la culture est arrêtée après 7 jours par fixation primaire avec glutaraldéhyde 4 % et paraformaldéhyde 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4). Les membranes étaient maintenues au fond des puits d'une plaque 24 puits par des bagues métalliques stériles. Nous avons voulu comparer les différentes conditions qui ont retenu notre attention : le e-PTFE natif comme « témoin », le e-PTFE fonctionnalisé par la PDA, le TPU. Nous avons également tenté des cultures avec PRF mais l'incompatibilité immunitaire entre les cellules du PRF et les cellules BJ ne nous a pas permis d'exploiter les résultats.

### Résultats

Les fibroblastes humains expriment de nombreux prolongements multidirectionnels à la surface du TPU et viennent mouler les nanofilaments (figure 111). Les observations montrent que d'une part les nanofilaments de TPU servent de support de progression de ces prolongements, d'autre part, les prolongements peuvent même pénétrer entre les nanofilaments, sous ceux-ci. Le tapis est certes encore faible, mais au bout de 5 jours de culture celui-ci semble s'étendre dans toutes les directions.

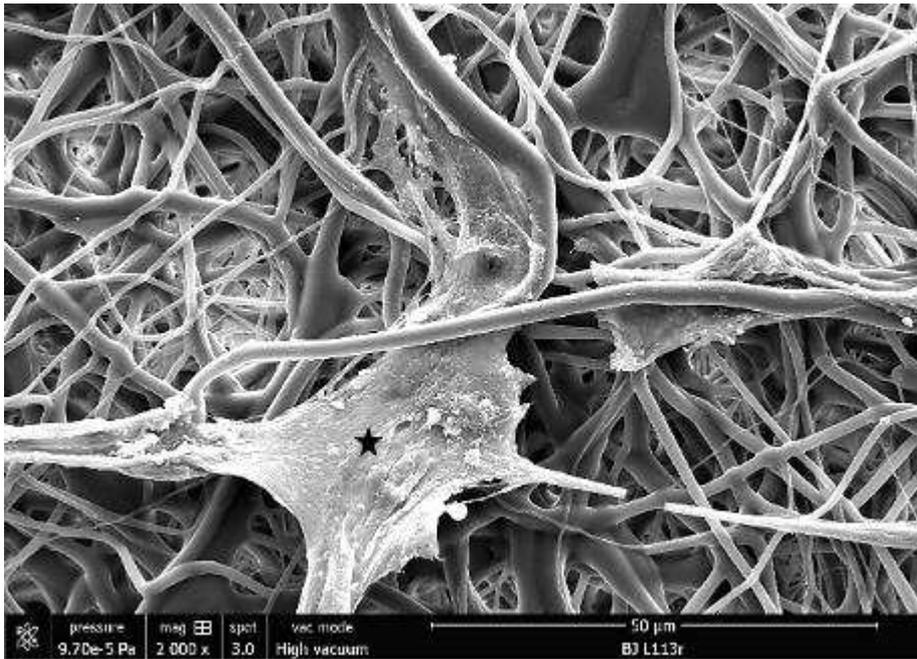


Figure 111 : micrographies en MEB. Les fibroblastes humains (étoile) s'étalent parfaitement à la surface du TPU

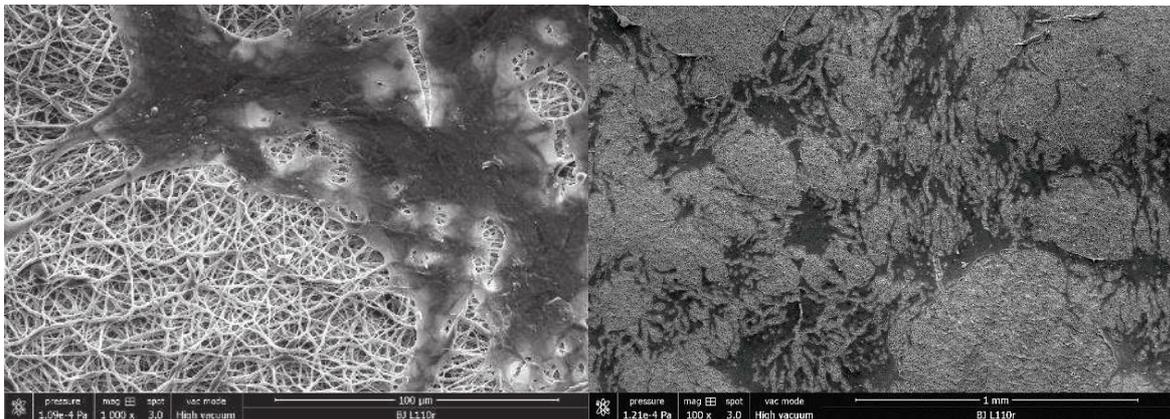


Figure 112 : monographie en MEB. Les cellules forment un tapis qui tend à s'uniformiser de proche en proche

Par comparaison, les fibroblastes sont très peu nombreux à la surface du e-PTFE natif, et peu adhérents, les prolongements sont moins longs comme devant s'interrompre par défaut de connexions satisfaisantes. Les cellules rencontrent encore une fois une barrière physique au niveau des bandes rugueuses inhibant l'expansion multidirectionnelle que l'on retrouve sur le TPU. Cependant, la fonctionnalisation par PDA compense au moins partiellement ceci puisque l'on constate des cellules plus étalées que sur e-PTFE, plus d'interconnexion et une adhésion au support qui semble meilleure (figure 113).

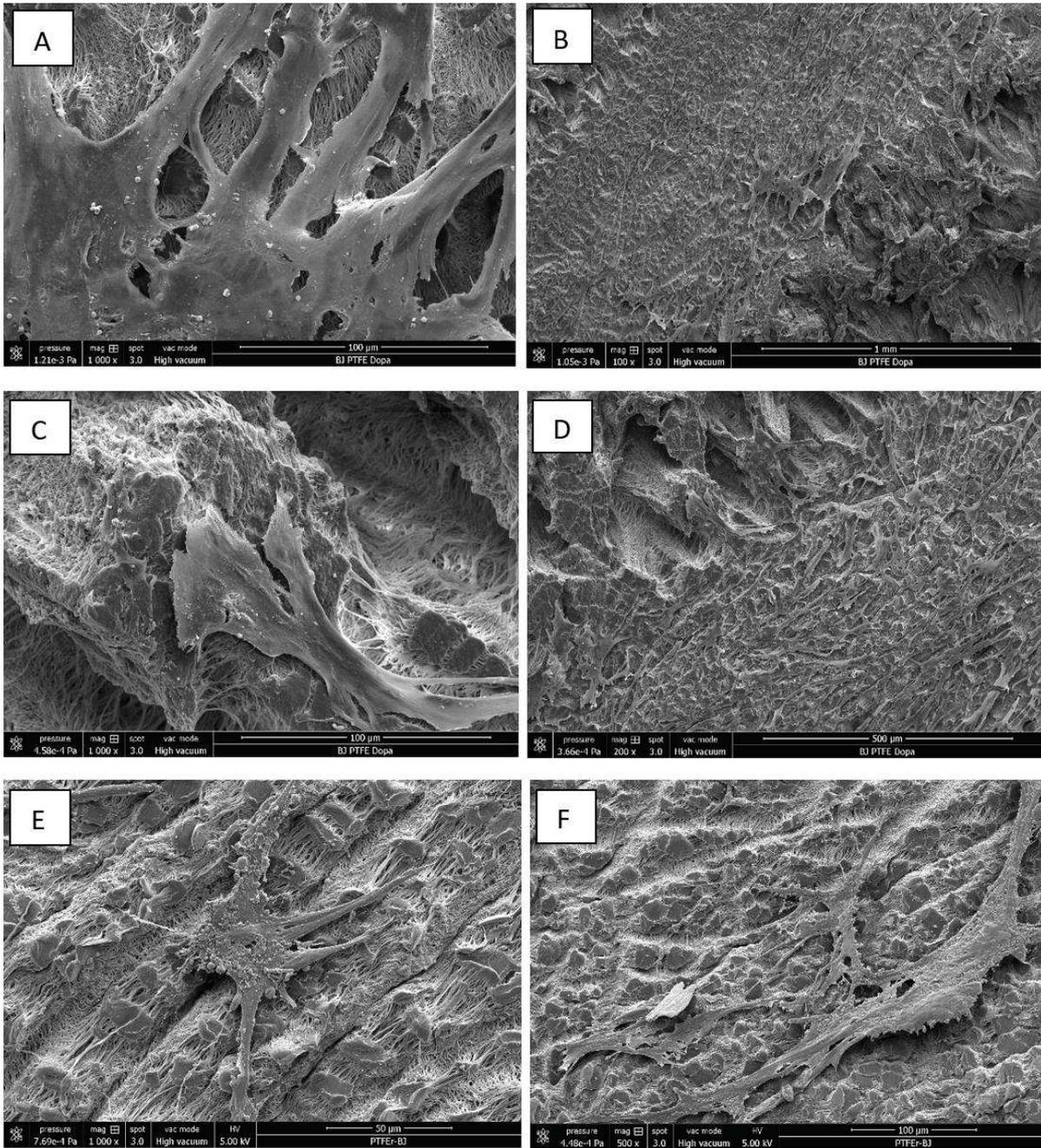


Figure 113 : micrographie en MEB. Images A à D : aspect des fibroblastes BJ sur le e-PTFE fonctionnalisé par la PDA. Images E et F : fibroblastes à la surface du e-PTFE natif

## f) Conclusions et perspectives

Quels éléments pouvons-nous avancer de nos premiers essais ?

- Nous obtenons une membrane à l'architecture monolytique évitant ainsi les risques de délaminage et les faiblesse d'une interface de collage entre 2 couches
- Cette membrane de TPU est biface permettant de différencier la réponse cellulaire sur chacune des 2 faces. Cependant, nous devons améliorer encore la qualité de la face lisse de notre membrane.
- Nous avons la capacité de faire varier la taille des nanofilaments et des pores entre les filaments afin de faire varier et les propriétés mécaniques et les réponses biologiques.
- Notre membrane est hydrophobe au même titre que le e-PTFE, élément sur lequel nous pouvons progresser par le biais de la fonctionnalisation comme nous l'avons fait pour le e-PTFE.
- Nous obtenons une membrane répondant au cahier des charges d'un point de vue mécanistique avec une étirabilité d'au moins 300 % sans rupture en étirement uniaxial. Cependant, une déformation plastique apparaît dans ces conditions. Nous devons aller plus loin par la réalisation de tests de gonflement et de fatigabilité, si possible en atmosphère humide et à 37 °C afin de se rapprocher des conditions cliniques.
- Les tests de viabilité cellulaire et à la recherche d'une réponse inflammatoire sont encourageants car superposables aux résultats obtenus avec le e-PTFE.

Si l'on fait le point sur la littérature, les évaluations biologiques de membranes de TPU obtenues par électrofilage décrites semblent satisfaisantes et certains articles mentionnent une importante infiltration cellulaire (110-112) ce qui va dans le sens de nos observations et nous encourage à poursuivre nos travaux.

## CONCLUSION GENERALE

La hernie diaphragmatique congénitale est une maladie rare dont l'amélioration de la prise en charge fait partie des axes prioritaires du ministère de la santé par le biais de la définition des PNMR. De plus en plus de formes sévères arrivent maintenant à la chirurgie du fait des énormes progrès réalisés dans le domaine de la prise en charge fœtale et réanimatoire post-natale. Ces formes imposent le plus souvent la mise en place d'une prothèse diaphragmatique, ce qui est un facteur indépendant de récurrence herniaire par lâchage de prothèse. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces lâchages est l'inadéquation entre la croissance de l'enfant (d'un facteur 4 entre 0 et 15 ans) et les capacités adaptatives de la prothèse. La revue de la littérature ainsi que nos travaux sur le e-PTFE natif (matériau le plus couramment implanté) et sur des explants nous ont montré que la prothèse diaphragmatique idéale n'existe pas. Les principaux reproches que l'on puisse faire aux prothèses en e-PTFE actuellement utilisées relèvent de ses propriétés mécaniques : manque d'élasticité, rigidité...

- Finalement les investigations et analyses menées lors de ces travaux de thèse ont permis de définir précisément le cahier des charges d'une prothèse diaphragmatique idéale implantée en période néonatale : biocompatible, résistante à la traction, souple pour suivre les mouvements physiologiques de la ventilation et de la mobilisation de l'enfant. Elle doit être composée d'un matériau suffisamment inerte pour éviter les réactions inflammatoires (prévenir les adhérences) sur le versant abdominal, et avoir la capacité d'être remplacée ou renforcée par le tissu biologique sur le versant thoracique, afin de favoriser son intégration tissulaire. Si ce biomatériau est insuffisamment colonisé par les tissus adjacents, il devrait au moins tolérer un facteur de croissance surfacique de quatre.
- Après avoir défini ce cahier des charges nous avons travaillé sur 2 axes simultanément : la fonctionnalisation du e-PTFE pour en améliorer son intégration

biologique et l'élaboration d'un biomatériau innovant en TPU. A cet égard, nous avons mis au point deux stratégies de fonctionnalisation chimique par la polydopamine des membranes de e-PTFE réputé inerte. Les 2 méthodes développées sont simples à mettre en œuvre, peu coûteuses, écologiques. Nos investigations biologiques, menées in vitro, montrent clairement l'apport favorable des traitements par le PDA du e-PTFE. De plus, nos travaux offrent la possibilité de ne recouvrir qu'une seule face de la prothèse ce qui est un des points requis dans le cahier des charges.

- Dans le but de guider l'intégration tissulaire, nous avons complété le traitement surfacique à la PDA avec un revêtement de nature biologique, le PRF. Nos résultats soulignent l'intérêt de cette méthode qui demande cependant à être confirmée (travaux programmés). En effet, le PRF a fait la preuve de son efficacité comme adjuvant à la cicatrisation dans de nombreuses indications mais n'a jamais été évalué comme support de recouvrement d'une prothèse inerte. Nos travaux montrent que le PRF interagit peu avec une membrane de e-PTFE natif mais que la fonctionnalisation par la PDA permettait une bien meilleure rétention des éléments biologiques du PRF et donc potentiellement, une optimisation de la colonisation par l'hôte. Cette étape reste à démontrer par des cultures in vitro.
- En fin de compte, nos travaux menés sur la mise au point d'un matériau étirable et biface ont également porté leur fruit. Nous avons effectivement produit une nouvelle membrane en TPU, biface, obtenue par électrofilage et dont on est capable de faire varier l'ultrastructure afin de moduler la réponse biologique. Les premiers tests sont très encourageants avec une élasticité sans rupture nettement supérieure à ce que nous avons pu observer avec le e-PTFE en traction uniaxiale. La biocompatibilité semble non seulement satisfaisante in vitro, mais l'interaction avec les cellules semble plus forte, plus harmonieuse que sur le e-PTFE.

- Bien entendu, nous allons maintenant appliquer les moyens de fonctionnalisation (chimique et biologique) mis au point dans le cadre de cette thèse à cette nouvelle membrane.

**Ces travaux ont reçu le soutien financier et moral de l'association FIMATHO et nous sommes actuellement accompagnés par la FMR et la SATT connectus afin de poursuivre le développement de ce matériau innovant et d'aller vers un dépôt de brevet.**

## Références

- 1 : Ackerman KG, Pober BR. Congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia: new insights from developmental biology and genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007 ; 145(2) : 105-108
- 2 : Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg.* 2005 ; 190(2) : 324-332
- 3 : Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol.* 1985 ; 83(2) : 338-347
- 4 : Scandalakis J., Gray S., Rickette R. *The diaphragm Embryology for surgeons* Baltimore, MD: Williams and Wilkins (1994). p. 491–539
- 5 : Alles AJ, Losty PD, Donahoe PK, Manganaro TF, Schnitzer JJ. Embryonic cell death patterns associated with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1995 ; 30(2) : 353-358
- 6 : Babiuk RP, Greer JJ. Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 ; 283(6) : 1310-1314
- 7 : Doi T, Sugimoto K, Ruttenstock E, Dingemann J, Puri P. Prenatal retinoic acid upregulates pulmonary gene expression of PI3K and AKT in nitrofen-induced pulmonary hypoplasia. *Pediatr Surg Int.* 2010 ; 26(10) : 1011-1015
- 8 : Ruttenstock E, Doi T, Dingemann J, Puri P. Insulinlike growth factor receptor type 1 and type 2 are downregulated in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 2010 ; 45(6) : 1349-1353

- 9 : Pober BR. Genetic aspects of human congenital diaphragmatic hernia. Clin Genet. 2008 ; 74(1) : 1-15
- 10 : Keller RL, Tacy TA, Hendricks-Munoz K, Xu J, Moon-Grady AJ, Neuhaus J, Moore P, Nobuhara KK, Hawgood S, Fineman JR. Congenital diaphragmatic hernia: endothelin-1, pulmonary hypertension, and disease severity. Am J Respir Crit Care Med. 2010 ; 182(4) : 555-561
- 11 : Morini F, Lally PA, Lally KP, Bagolan P. The congenital diaphragmatic hernia study group registry. Eur J Pediatr Surg. 2015 ; 25(6) : 488-496
- 12 : Wright JC, Budd JL, Field DJ, Draper ES. Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia : a 9-year experience. PaediatrPerinat Epidemiol 2011 ; 25(2) : 144-149
- 13 : Metkus AP, Filly RA, Stringer MD, Harrison MR, Adzick NS. Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg 1996 ; 31(1) : 148-151
- 14 : Jani J, Nicolaides KH, Keller RL, Benachi A, Peralta CF, Favre R, Moreno O, Tibboel D, Lipitz S, Eggink A, Vaast P, Allegaert K, Harrison M, Deprest J; Antenatal-CDH-Registry Group. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. Ultrasound Obstet Gynecol. 2007 ; 30(1) : 67-71
- 15 : Stranak Z, Krofta L, Haak LA, Vojtech J, Haslik L, Rygl M, Pycha K, Feyereisl J. Antenatal assessment of liver position, rather than lung-to-head ratio (LHR) or observed/expected LHR, is predictive of outcome in fetuses with isolated left-sided diaphragmatic hernia. J Mater Fetal Neonatal Med. 2017 ; 30(1) : 74-78
- 16 : Deprest JA, Flemmer AW, Gratacos E, Nicolaides K. Antenatal prediction of lung volume and in-utero treatment by fetal endoscopic tracheal occlusion in severe isolated congenital diaphragmatic hernia. Semin Fetal Neonatal Med 2009 ; 14(1) : 8-13

17 : Deprest JA, Flake AW, Gratacos E, Ville Y, Hecher K, Nicolaides K, Johnson MP, Luks FI, Scott Adzick N, Harrison MR. The making of fetal surgery. *Prenat Diagn.* 2010 ; 30 : 653–667

18 : Ruano R, Martinovic J, Dommergues M, Aubry MC, Dumez Y, Benachi A. Accuracy of fetal lung volume assessed by three-dimensional sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005 ; 26(7) : 725-730

19 : Mahieu-Caputo D, Sonigo P, Dommergues M, Fournet JC, Thalabard JC, Abarca C, Benachi A, Brunelle F, Dumez Y. Fetal lung volume measurement by magnetic resonance imaging in congenital diaphragmatic hernia. *BJOG* 2001 ; 108(8) : 863-868

20 : Sananes NP, Debry C, Regnard P, Miry C, Fellmann L, Haelewyn L, Delaine M, Gaudineau A, Mottet N, Schneider A, Langer B, Favre R. New balloon for fetal endoscopic tracheal occlusion. In vitro tests and evaluation in the nonhuman primate model. *AJOG.* 2018 : S292-S293

21 : DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, Wilson JM. Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia *J Pediatr Surg* 1994 : 29(2) : 248-256

22 : Danzer E, Hedrick HL. Controversies in the management of severe congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 ; 19(6) : 376-384

23 : Zani A, Zani-Ruttenstock E, Pierro A. Advances in the surgical approach to congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 ; 19(6) : 364-369

24 : McGiven MR, Best KE, Rankin J, Wellesley D, Greenless R, Addor MC, Arriola L, de Walle, H., Barisic, I., Beres, J., Bianchi, F., Calzolari, E., Doray, B., Draper, E. S., Garne, E., Gatt, M., Haeusler, M., Khoshnood, B., Klungsoyr, K., Latos-Bielenska, A., O'Mahony, M., Braz, P., McDonnell, B., Mullaney, C., Nelen, V., Queisser-Luft, A., Randrianaivo, H., Rissmann, A., Rounding, C., Sipek, A., Thompson, R., Tucker, D., Wertenlecker, W. & Martos,

C. Epidemiology of congenital diaphragmatic hernia in Europe : a register-based study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2015 ; 100(2) : F137-F144

25 : Arnaud A, Martin A, Habonimana E, Fremont B. Single transversus abdominis muscle flap: Another possibility for large congenital diaphragmatic hernia repair. J Thorac Cardiovasc Surg 2016 ; 152(3) : 925-926

26 : Zani A, Eaton S, Puri P, Rintala R, Lukac M, Bagolan P, Kuebler JF, Friedmacher F, Hoellwarth ME, Wijnen R, Tovar J, Pierro A ; EUPSA Network Office. International Survey on the Management of Congenital Diaphragmatic Hernia. Eur J Pediatr Surg. 2016 ; 26(1) : 38–46

27 : Nasr A, Struijs MC, Ein SH, Langer JC, Chiu PP. Outcomes after muscle flap vs prosthetic patch repair for large congenital diaphragmatic hernias. J Pediatr Surg. 2010 ; 45(1) : 151–154

28 : Lally KP, Lasky RE, Lally PA, Bagolan P, Davis CF, Frenckner BP, Hirschl RM, Langham MR, Buchmiller TL, Usui N, Tibboel D, Wilson JM; Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Standardized reporting for congenital diaphragmatic hernia- an international consensus. J Pediatr Surg. 2013 ; 48(12) : 2408-2415

29 : Gorincour G, Bouvenot J, Mourot MG, Sonigo P, Chaumoitre K, Garel C, Guibaud L, Rypens F, Avni F, Cassart M, Maugey-Laulom B, Bourlière-Najean B, Brunelle F, Durand C, Eurin D; Groupe Radiopédiatrique de Recherche en Imagerie Foetale (GRRIF). Prenatal prognosis of congenital diaphragmatic hernia using magnetic resonance imaging measurement of fetal lung volume. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005 ; 26(7) : 738-744

30 : Reiss I, Schaible T, Van den Hout L, Capolupo I, Allegaert K, van Heijst A, Gorett Silva M, Greenough A, Tibboel D. Standardized postnatal management of infants with congenital diaphragmatic hernia in Europe : the CDH EURO consortium consensus. Neonatology. 2010 ; 98(4) : 354-364

- 31 : Janssen S, Heiwegen K, van Rooij IA, Scharbatke H, Roukema J, de Blaauw I, MBI Botden SM. Factors related to long-term surgical morbidity in congenital diaphragmatic hernia survivors. *J Ped Surg.* 2018 ; 53(3) : 508–512
- 32 : Gasior AC, St. Peter SD. A review of patch options in the repair of congenital diaphragm defects. *Pediatr Surg Int.* 2012 ; 28(4) : 327-333
- 33 : Loff S, Wirth H, Jester I, Hosie S, Wollmann C, Schaible T, Ataman O, Waag KL. Implantation of a cone-shaped double-fixed patch increases abdominal space and prevents recurrence of large defects in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2005 ; 40(11) : 1701-1705
- 34 : DeCoppi P, Deprest J. Regenerative medicine solutions in congenital diaphragmatic hernia. *Sem Pediatr Surg.* 2017 ; 26(3) : 171–177
- 35 : Canadian Congenital Diaphragmatic Hernia Collaborative, Puligandla PS, Skarsgard ED, Offringa M, Adatia I, Baird R, Bailey M, Brindle M, Chiu P, Cogswell A, Dakshinamurti S, Flageole H, Keijzer R, McMillan D, Oluoyomi-Obi T, Pennaforte T, Perreault T, Piedboeuf B, Riley SP, Ryan G, Synnes A, Traynor M. Diagnosis and management of congenital diaphragmatic hernia: a clinical practice guideline. *CMAJ.* 2018 ; 190(4) : E103-112
- 36 : Ebnesajjad S. Expanded PTFE applications handbook : technology, manufacturing and applications, Oxford. Ed Elsevier 2017, p286
- 37 : Novitsky YW, Harrell GA, Cristiano JA, Paton L, Norton HJ, Peindl RD, Kercher KW, Heniford BT. Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit. *J Surg Res.* 2007 ; 140(1) : 6-11
- 38 : Kamran A, Zendejas B, Demehri FR, Nath B, Zurakowski D, Smithers CJ. Risk factors for recurrence after thoracoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *J Pediatr Surg.* 2018 ; 53(11) : 2087–2091

- 39 : Smith MJ, Paran TS, Quinn F, Corbally MT. The SIS extracellular matrix scaffold: preliminary results of use in congenital diaphragmatic hernia (CDH) repair. *Pediatr Surg Int*. 2004 ; 20(11-12) : 859–862
- 40 : Romao RL, Nasr A, Chiu PP, Langer JC. What is the best prothetic material for patch repair of congenital diaphragmatic hernia ? Comparaison and meta-analysis of porcine small intestine submucosa and polytetrafluoroethylene. *J Pediatr Surg*. 2012 ; 47(8) : 1496-1500
- 41 : Mitchell IC, Garcia NM, Barber R, Ahmad N, Hicks BA, Fischer AC. Permacol patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair. *J Pediatr Surg*. 2008 ; 43(12) : 2161-2164
- 42 : Cornwell K, Greenburg AG, James KS. A generative tissue fabricated with SurgiMend has a mesothelial lining limiting adhesion formation in a model of large ventral hernia repair. Presented at the American Hernia Society, Orlando, FL. 2010
- 43 : Urita Y, Komuro H, Chen G, Shinya M, Saihara R, Kaneko M. Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold : an experimental study in a rat model. *Pediatr Surg Int*. 2008 ; 24(9) : 1041-1045
- 44 : Rossi CA, Pozzobon M, Ditadi A, Archacka K, Gastaldello A, Sanna M, Franzin C, Malerba A, Milan G, Cananzi M, Schiaffino S, Campanella M, Vettor R, De Coppi P. Clonal characterization of rat muscle satellite cells: proliferation, metabolism and differentiation define an intrinsic heterogeneity. *PLoS One*. 2010 ; 5(1) : e8523
- 45 : Conconi MT, Bellini S, Teoli D, de Coppi P, Ribatti D, Nico B, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Morpurgo M, Parnigotto PP. In vitro and in vivo evaluation of acellular diaphragmatic matrices seeded with muscle precursors cells and coated with VEGF silica gels to repair muscle defect of the diaphragm. *J Bio med Mater Res A*. 2009 ; 89(2) : 304–316
- 46 : Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998 ; 279(5356) : 1528–1530

- 47 : Gubareva EA , Sjoqvist S, Gilevich IV, Sotnichenko AS, Kuevda EV, Lim ML, Feliu N, Lemon G, Danilenko KA, Nakokhov RZ, Gumenyuk IS, Grigoriev TE, Krasheninnikov SV, Pokhotko AG, Basov AA, Dzhimak SS, Gustafsson Y, Bautista G, Beltran Rodriguez A, Pokrovsky VM, Jungelbluth P, Chvalun SN, Holterman MJ, Taylor DA, Macchiarini P. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials*. 2016 ; 77 : 320–335
- 48 : Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, Kyba M, Perlingeiro RC. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med*. 2008 ; 14(2) : 134–143
- 49 : Turner CG, Klein JD, Steigman SA, Armant M, Nicksa GA, Zurakowski D, Ritz J, Fauza DO. Preclinical regulatory validation of an engineered diaphragmatic tendon made with amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg*. 2011 ; 46(1) : 57-61
- 50 : De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Bio technol*. 2007 ; 25(1) : 100-106
- 51: Newman BM, Jewett TC, Lewis A, Cerny F, Khan A, Karp M, Cooney DR. Prosthetic materials and muscle flaps in the repair of extensive diaphragmatic defects: an experimental study. *J Pediatr Surg*. 1985 ; 20(4) : 362-367
- 52 : Kimber CP, Dunkley MP, Haddock G, Robertson L, Carey FA, Cuschieri A. Patch incorporation in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2000 ; 35(1) : 120-123
- 53 : Butt HJ, Jaschke M. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*. 1995 ; 6 : 1-7
- 54 : Hertz H. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte. Mathematik*. 1881 ; 92 : 156-171

- 55 : Korhonen RK, Saarakkala S. Biomechanics and Modeling of Skeletal Soft Tissues. Theoretical Biomechanics, Vaclav Klika (Ed.), 2011
- 56 : Schneider A, Talon I Mathieu E, Schaaf P, Becmeur F, Hemmerlé J. New insight in the biological integration of polytetrafluoroethylene from an explant used for diaphragm repair. J Biomater Appl. 2017 ; 31(6) : 844–850
- 57 : Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell. 2006 ; 126(4) : 677-689
- 58 : Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 ; 7(3) : 211-224
- 59 : Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials. 2008 ; 29(20) : 2941-2953
- 60 : Schneider A, Koob M, Sananes N, Senger B, Hemmerle J, Becmeur F. Computed tomographic study of the pediatric diaphragmatic growth : application to the treatment of congenital diaphragmatic hernia. Eur J Pediatr Surg. 2017 ; 27(2) : 177-180
- 61 : Saade J, Ladjal H, Behzad S, Beuve M, Azencot J (2012). Modelisation biomecanique du diaphragme humain : du CT-4D au modèle du mouvement. RFIA 2012 (reconnaissance des formes et intelligence artificielle), 2012, Lyon, France. pp.978-2
- 62 : Lally KP, Paranka MS, Roden J, Georgeson KE, Wilson JM, Lillehei CW, Breaux CW Jr, Poon M, Clark RH, Atkinson JB. Congenital diaphragmatic hernia. Stabilization and repair on ECMO. Ann Surg. 1992 ; 216(5) : 569-573
- 63 : Atkinson JB, Poon MW. ECMO and the management of congenital diaphragmatic hernia with large diaphragmatic defects requiring a prosthetic patch. J Pediatr Surg. 1992 ; 27(6) : 754-756

- 64 : Falconer AR, Brown RA, Helms P, Gordon I, Baron JA. Pulmonary sequelae in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Thorax*. 1990 ; 45(2) : 126-129
- 65 : Steigman SA, Oh JT, Almendinger N, Javid P, La Van D, Fauza D. Structural and biomechnical characteristics of the diaphragmatic tendon in infancy and childhood : an initial analysis. *J Pediatr Surg*. 2010 ;45(7) :1455-1458
- 66 : Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science*. 2007 ; 318(5849) : 426–430
- 67 : Xi ZY, Xu YY, Zhu LP, Wang Y, Zhu BK. A facile method of surface modification for hydrophobic polymer membranes based on the adhesive behavior of poly(DOPA) and poly(dopamine). *J Membr Sci*. 2009 ; 327 : 244–253
- 68 : Faure E, Falentin-Daudre C, Jerome C, Lyskawa J, Fournier D, Woisel P, Detrembleur C. Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. *Prog Polym Sci*. 2013 ; 38(1) : 236-270
- 69 : Dreyer DR, Miller DJ, Freeman BD, Paul DR, Bielawski CW. Elucidating the structure of poly(dopamine). *Langmuir*. 2012 ; 28 : 6428-6435
- 70 : Bernsmann F, Voegel JC, Ball V. Different synthesis methods allows to tune the permeability and permselectivity of dopamine-melanin films to electrochemical probes. *Electrochim Acta*. 2011 ; 56 : 3914-3919
- 71 : D'Ischia M, Napolitano A, Ball V, Chen CT, Buehler MJ. Polydopamine and eumelanin : from structure-property relationships to a unified tailoring strategy. *Acc Chem Res*. 2014 ; 47(12) : 3541-3550
- 72 : Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials : synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chem Rev*. 2014 ; 114(9) : 5057-5115

73 : Langmuir I, Schaeffer VJ. Composition of fatty acid films on water containing calcium or barium salts. J Am Chem Soc. 1936 ; 58 : 284-287

74 : Talon I, Schneider A, Mathieu E, Senger B, Frisch B, Seguin C, Ball V, Hemmerlé J. How polydopamine modulates biological responses to PTFE prostheses. Mat Sci Appl. 2019 ; 10(05) : 377-392

75 : Ponzio F, Le Houerou V, Zafeiratos S, Gautier C, Garnier T, Jierry L, Ball V. Robust alginate-catechol-polydopamine free-standing membranes obtained from the water/air interface. Langmuir. 2017 ; 33(9) : 2420-2426

76 : Kharraz, Y., Guerra, J., Mann, C.J., Serrano, A.L., Muñoz-Cánoves, P. Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. Mediators of Inflammation. 2013 ; 2013 : 491497

77 : McWhorter, F.Y., Wang, T., Nguyena, P., Chung, T., Liu W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. PNAS. 2013 ; 110(43) : 17253-17258

78 : Dohan DM, Choukroun J, Diss A, SL Dohan, J Dohan, J Mouhyi, Gogly B. Fibrine riche en plaquettes (PRF): Concentré en plaquette de deuxième génération. Partie I: Concepts technologiques et évolution. Chirurgie orale Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 101: 37-44.

79 : Dohan DM, J Choukroun, A Diss, Dohan SL, J Dohan, J Mouhyi, Gogly B. Fibrine riche en plaquettes (PRF): Concentré en plaque de deuxième génération. II: Caractéristiques biologiques liées aux plaquettes. Orch Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 101: 45-50,

80 : Dohan DM, J Choukroun, Diss A, SL Dohan, JA Mouhyi, Gogly B. Gogly B. Plateled-rich fibrine (PRF): Concentré en plaque de deuxième génération, Partie III: Activation des leucocytes: Nouvelle fonctionnalité des concentrés plaquettaires, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 101: 51-55

81 : Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. Osterr Z Stomatol. 1970 ; 67 : 338-359

- 82 : Matras H. Fibrin sealant in maxillofacial surgery. Development and indications. A review of the past 12 years. *Facial Plast Surg.* 1985 ; 2 : 297-313
- 83 : Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994 ; 52(2) : 161-166
- 85 : Dohan S, Dohan A, Choukroun J, Diss A ? Silonpieri A, Girard MO, Dohan D. De l'usage des concentrés plaquettaires autologues en application topique. EMC (Elsevier SAS, Paris), Odontologie, 23-330-A-30, 2005
- 85 : Dugrillon A, Eicher H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local applicaiton in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 ; 31(6) : 615-659
- 86 : Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie : le PRF. *Implantodontie.* 2001 ; 42 : 55-62
- 87 : Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-rich fibrin : a second génération platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann Maxillofac Surg.* 2011 ; 1(1) : 53-57
- 88 : Bai MY, Chuang MH, Lin MF, Tang SL, Wong CC, Chan WP. Relationships of age and sex with cytokine content and distribution in Human Platelet firbin Gels. *Sci Rep.* 2018 ; 8(1) : 10642
- 89 : Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jimenez P, Del Corso M, Kang BS, Nally M, Lanata N, Wang HL, Quirynen M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2018 ; 29(2) : 171-184
- 90 : Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 ; 936 : 11-30

- 91 : Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Peirodontol.* 2010 ; 81(4) : 546-555
- 92 : Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan JA, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-Rich Fibrin (PRF): a new healing biomaterial. Part II: Platelets and cytokines. *Implantodontie.* 2004 ; 13 : 99-108.
- 93 : Koskievic R, Garel LM, Rouah Y. Facteurs de croissance plaquettaires en implantologie orale: mythes ou réalités? Première partie: Aspects fondamentaux. *Implant.* 2003,2, 4, 263-281.
- 94 : Clotilde Nicolet. Intérêt du PRF dans la qualité de la cicatrisation : état actuel des connaissances et controverses. *Autre (q-bio.OT).* 2012
- 95 : Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016 ; 20(9) : 2353-2360
- 96 : Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015 ; 473(5) : 1635-43
- 97 : Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 ; 13(7) : 1145-52.
- 98 : Burnouf T, Tseng YH, Kuo YP, Su CY. Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the release of growth factors. *Transfusion.* 2008 ; 48 : 1090-1098

- 99 : He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 ; 108(5) : 707-713
- 100 : Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, Tazzari PL, O'Connell SM, Ricci F, Pierini M, Squarzone S, Pagliaro PP, Oprita EI, Donati D. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *European Cells and Materials.* 2010 ; 20 : 1-23
- 101 : Gurbuzer B, Pıkdöken L, Tunali M, Urhan M, Küçükodacı Z, Ercan F. Scintigraphic Evaluation of Osteoblastic Activity in Extraction Sockets Treated With Platelet-Rich Fibrin. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 ; 68(5) : 980-989
- 102 : Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, Hayes V, Masefski W, Litvinov RI, Rauova L, Lowery TJ, Weisel JW. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* 2014 ; 123(10) : 1596-1603
- 103 : Söderström AC, Nybo M, Nielsen C, Vinholt PJ. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clin Chem Lab Med.* 2016 ; 54(12) : 1913-1920
- 104 : Drobny, J. G. 9 - Thermoplastic Polyurethane Elastomers. in *Handbook of Thermoplastic Elastomers (Second Edition)* 233–253 (William Andrew Publishing, 2014. Chen, Q., Liang, S. & Thouas, G. A. *Elastomeric biomaterials for tissue engineering.* (2012).
- 105 : Baudis S, Ligon SC, Seider K, Weigel G, Grasl C, Bergmeister H, Schimq H, Liska R. Hard-Block Degradable Thermoplastic Urethane-Elastomers for Electrospun Vascular Prostheses. *J polym Sci Part A Polym chem.* 2012 ; 50(7) :1272-1280
- 106 : Bergmeister H, Seyidova N, Schreiber C, Strobl M, Grasl C, Walter I, Messner B, Baudis S, Fröhlich S, Marchetti-Deschmann M, Griesser M, di Franco M, Krssak M, Liska R, Schima H. Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *Acta Biomaterialia.* 2015 ; 11 : 104–113

107 : Bergmeister H, Schreiber C, Grasl C, Walter I, Plasenzotti R, Stoiber M, Bernhard D, Schima H. Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities. *Acta Biomaterialia*. 2013 ; 9 : 6032–6040

108 : Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006 ; 17 : 89-106

109 : Lavielle N, Popa AM, de Geus M, Hebraud A, Schlatter G, Thöny-Meyer L, Rossi RM. Controlled formation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) ultrathin electrospun nanofibers in a hydrolytic degradation-assisted process. *Eur. Polym. J.* 2013 ; 49 : 1331–1336

110 : Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006 ; 17(14) : 89-106

111 : Yu E, Mi HY, Zhang J, Thomson JA, Turng LS. Development of Biomimetic Thermoplastic Polyurethane/Fibroin Small-Diameter Vascular Grafts via a Novel Electrospinning Approach. *J Biomed Mater Res A*. 2018 ; 106(4) : 985-996

112 : Yu, Zhang J, Thomson JA, Turng LS. Fabrication and Characterization of Electrospun Thermoplastic Polyurethane/Fibroin Small-Diameter Vascular Grafts for Vascular Tissue Engineering. *Int Polym Process*. 2016 ; 31(5) : 638-646

[Schneider et al. - 2017 - New insight in the biological integration of polyt.pdf](#)

[How Polydopamine Modulates Biological Responses to.pdf](#)

[Fonctionnalisation chimique et biologique de biomatériaux-final version \\_jh IT\[7048\].docx](#)

[articles\JSURGRES-D-19-00684\[6906\].pdf](#)