



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE

Laboratoire Biomatériaux et Bioingénierie UMR_S 1121

THÈSE présentée par :

Anne SCHNEIDER

soutenue avec accords de confidentialité le : **21 septembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie - Physique

**Caractérisation et optimisation de
biomatériaux pour le traitement de la Hernie
Diaphragmatique Congénitale à large défaut**

THÈSE dirigée par :

M. HEMMERLE Joseph

M. BECMEUR François

Docteur, Université de Strasbourg

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. WEISS Pierre

Mme GANGLOFF Sophie

Professeur, Université de Nantes

Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme BOUBNOVA Julia

Mme BAHLOULI Nadia

Docteur, Centre de Référence des Hernies Diaphragmatiques, Marseille

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaite avant tout remercier très sincèrement mon directeur de thèse, le Dr Joseph Hemmerlé, pour m'avoir encadrée de façon bienveillante durant mes années de doctorat. Merci à toi d'avoir fait confiance à un « chirurgien » et de m'avoir accompagnée dans le monde de la recherche. Je te remercie pour l'ensemble des connaissances partagées et pour tes précieux conseils. Nos discussions vont me manquer !

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Pr François Becmeur, pour votre enthousiasme sans limite concernant ce projet de recherche et pour m'avoir permis de concrétiser ces travaux.

Je tiens à remercier les membres du jury, le Pr Pierre Weiss, le Pr Sophie Gangloff, le Dr Julia Boubnova et le Pr Nadia Bahlouli, d'avoir accepté de lire et de juger ma thèse. Je leur adresse toute ma reconnaissance.

Je souhaite adresser ma très grande gratitude au Pr Pierre Schaaf pour m'avoir accueillie au sein de l'unité Inserm UMR_S 1121, ainsi qu'à M. Jean Claude Voegel qui a eu foi en ce projet dès le commencement.

Un très grand merci à tous les membres de l'unité Inserm 1121 et en particulier au Pr Vincent Ball pour son expertise dans le domaine de la fonctionnalisation avec la polydopamine ; Eric Mathieu pour sa disponibilité et son aide précieuse en microscopie électronique ; Florent Meyer et Géraldine Koenig pour leur formation à la culture cellulaire ; Bernard Senger pour ses conseils avisés en statistiques ; Benoit Frisch pour les discussions scientifiques autour d'une bière artisanale ; Christiane Bouthier pour sa patience et son aide dans toutes les démarches administratives.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Pr Nadia Bahlouli de l'UMR 7357 et au Dr Christiane Wagner Kocher du LMGC à Montpellier, pour leur initiation au domaine de la mécanique. Je remercie amicalement Elham Mohsenzade et toute l'équipe du LPMT de Mulhouse pour tous leurs travaux concernant les techniques d'électrofilage.

J'aimerais remercier tous mes collègues du service de chirurgie pédiatrique de l'Hôpital de Hautepierre car sans eux, tout ceci n'aurait pas été réalisable ; j'adresse en particulier mes remerciements à Isabelle Talon et te souhaite bon courage pour ton doctorat.

De façon plus personnel, je tiens à remercier mes amis proches : Anne, Jérémie et Emma ; Carine, Fred et Elyne ; Caro, Fabrice et Maxime. Un grand merci à vous tous pour votre bonne humeur et tous les agréables moments passés en votre compagnie.

J'aimerais remercier ma famille, pour votre soutien et votre amour sans faille et tout particulièrement, mes parents, mes beaux-parents (merci Monique pour la relecture de ma thèse), ma sœur Claire et mon beau-frère Julien (merci M. le Professeur !), ainsi que Yann et Alicia.

Enfin, je remercie de tout cœur Jérôme, qui partage avec moi les petits comme les grands moments de la vie : parce que rien sans toi ne serait pareil, parce que tu sais comprendre et accepter malgré toutes les contraintes ; et un grand merci à notre boubou Léa, qui illumine nos vies de sa joie de vivre et de ses fous rires !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	19
 CHAPITRE 1 : ASPECTS ANATOMIQUES, CLINIQUES ET PROTHETIQUES DE LA HDC	 23
I) 1) La hernie diaphragmatique congénitale (HDC)	25
I) 1) a) Epidémiologie	25
I) 1) b) Classification	26
I) 1) c) Prise en charge prénatale.....	28
I) 1) d) Prise en charge néonatale.....	29
I) 2) Le traitement chirurgical des HDC	29
I) 2) a) Techniques chirurgicales.....	29
I) 2) a) 1. La laparotomie sous-costale	30
I) 2) a) 2. La thoracotomie latérale.....	30
I) 2) a) 3. Les approches mini-invasives (laparoscopie et thoracoscopie).....	31
I) 2) b) Les HDC à large défaut.....	33
I) 2) c) Les complications : focus sur la récurrence herniaire	35
I) 3) Revue de la littérature des prothèses diaphragmatiques.....	38
I) 3) a) Les prothèses synthétiques non résorbables	38
I) 3) b) Les prothèses naturelles résorbables	39
I) 3) c) Les prothèses naturelles et synthétiques résorbables.....	41
I) 3) d) Les biomatériaux au stade d'expérimentation animale	41
I) 4) Etude anatomique de la croissance diaphragmatique normale	44
I) 4) a) Objectifs	44
I) 4) b) Méthodologie	45

I) 4) c) Résultats	47
CHAPITRE 2 : LE POLYTETRAFLUOROETHYLENE	51
II) 1) Généralités sur le polytétrafluoroéthylène (PTFE)	53
II) 1) a) Structure et propriétés générales	53
II) 1) b) ePTFE en pratique clinique	54
II) 1) c) ePTFE utilisé en pratique clinique : analyse microscopique.....	55
II) 2) Principales méthodes de caractérisation	56
II) 2) a) Microscopie électronique à balayage (MEB).....	56
II) 2) b) Microscopie électronique en transmission (MET).....	58
II) 2) c) Microscopie à force atomique (AFM)	59
II) 2) d) Evaluation de la biocompatibilité	61
II) 2) d) 1. Culture cellulaire de fibroblastes dermiques humains	61
II) 2) d) 2. Culture cellulaire de cellules de la gelée de Wharton.....	62
II) 3) Caractérisation du ePTFE	63
II) 3) a) Caractérisation en microscopie électronique	63
II) 3) b) Etude <i>in vitro</i>	65
II) 3) c) Etude <i>in vivo</i>	69
II) 3) c) 1. Méthodologie.....	69
II) 3) c) 2. Résultats.....	71
II) 3) c) 3. Discussion.....	80
CHAPITRE 3 : METHODES DE FONCTIONNALISATION DU PTFE.....	85
III) 1) Fonctionnalisations avec la polydopamine	87
III) 1) a) Propriétés générales de la polydopamine	87
III) 1) b) Utilisation de la polydopamine en solution	88
III) 1) b) 1. Dépôt de polydopamine à l'interface solide/liquide	88
III) 1) b) 2. Moyen de contrôle du dépôt de polydopamine	89

III) 1) c) Formation d'un film de polydopamine à l'interface air/eau	91
III) 1) c) 1. Réalisation d'un film de PDA A/E et technique de transfert par la méthode de Langmuir-Schaeffer	91
III) 1) c) 2. Caractérisation du film de PDA A/E	92
III) 2) Évaluation biologique du PTFE fonctionnalisé avec la polydopamine	102
III) 2) a) Analyses <i>in vitro</i> en microscopie électronique : protocoles expérimentaux	102
III) 2) b) Résultats	103
III) 2) c) Discussion	107
 CHAPITRE 4 : ASPECTS BIOMECHANIQUES ET PERSPECTIVES	 111
 IV) 1) Approche mécanistique des récidives herniaires	 114
IV) 1) a) Généralités	114
IV) 1) a) 1. Etat des lieux	114
IV) 1) a) 2. Protocoles expérimentaux	115
IV) 1) b) Caractérisation mécanique du diaphragme sur un modèle animal	118
IV) 1) b) 1. Méthodologie	118
IV) 1) b) 2. Résultats	119
IV) 1) b) 3. Conclusion	120
IV) 1) c) Caractérisation mécanique de l'implant en ePTFE	121
IV) 1) c) 1. Méthodologie	121
IV) 1) c) 2. Résultats des essais de traction de la membrane de ePTFE	122
IV) 1) c) 3. Microscopie électronique à balayage du ePTFE sous étirement	124
IV) 1) d) Faisabilité d'un test de gonflement de la partie tendineuse du diaphragme	126
IV) 1) d) 1. Méthodes expérimentales	127
IV) 1) d) 2. Résultats	130
IV) 1) d) 3. Perspectives	131
 IV) 2) Développement de nouveaux biomatériaux pour le traitement de la HDC	 132
IV) 2) a) Technique d'électrofilage (electrospinning)	132
IV) 2) b) Description des premiers prototypes	134

IV) 2) b) 1. Utilisation du polyamide-6.....	134
IV) 2) b) 2. Utilisation du polyuréthane	138
IV) 2) c) Comparaison des premiers prototypes réalisés et perspectives	144
CONCLUSION GENERALE	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
LISTE DES PUBLICATIONS.....	163
Article 1.....	165
Article 2.....	179
Article 3.....	185
Article 4.....	189
Article 5.....	196
Article 6.....	203
Article 7.....	208

Index

AFM : Atomic Force Microscopy

α -MEM : Alpha Minimum Essential Medium

DMAE : Diméthylaminoéthanol

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

ECMO : Extracorporeal membrane oxygenation

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

ePTFE : Expanded polytetrafluoroethylene

ESEM : Environmental Scanning Electron Microscopy

HDC : Hernie diaphragmatique congénitale

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

MEC : Matrice extra-cellulaire

mfp : Mussel foot proteins

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique en transmission

MO : Microscopie optique

NSA : Nonenyl Succinic anhydride

PA-6 : Polyamide-6 ou polycaprolactane

PDA : Polydopamine

PDA A/E : Film de polydopamine à l'interface air/eau

PDA S/L : Film de polydopamine à l'interface solide/liquide

PU : Polyuréthane

SA : Semaine d'aménorrhée

SVF : Sérum de veau fœtal

TDM : Tomodensitométrie

TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

WJ-SC : Cellules de la gelée de Wharton

Liste des figures

Figure 1.1 : Illustration d'une HDC gauche chez un nouveau-né avec ascension des viscères abdominaux dans le thorax (Iconographie : <https://ufhealth.org/diaphragmatic-hernia#Photo>).

Figure 1.2 : Système de classification des HDC en fonction de la taille du défaut diaphragmatique selon The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry ». ⁴

Figure 1.3 : Vue peropératoire d'une hernie diaphragmatique gauche, abordée par laparotomie, après réduction des organes herniés ; la berge diaphragmatique (étoile) est réclinée afin de visualiser le moignon pulmonaire (flèche) (CHU de Strasbourg, France).

Figure 1.4 : Hernie diaphragmatique gauche après fermeture du défaut (Type B) par des points de suture entre les berges diaphragmatiques (CHU de Strasbourg, France).

Figure 1.5 : Hernie diaphragmatique gauche (Type C) avec remplacement diaphragmatique par une prothèse (5 x 6,5 cm) de type ePTFE (CHU de Strasbourg, France).

Figure 1.6 : Reconstructions scanographiques 3D montrant l'emplacement d'une prothèse diaphragmatique gauche chez un nouveau-né traité pour une HDC gauche type D, ainsi que sa configuration sous la forme d'un dôme (Pr L.Soler, IRCAD - IHU Strasbourg, France).

Figures 1.7 : a) 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 (CHU de Strasbourg, France).

Figure 1.8 : Coupe tomodensitométrique d'une récurrence postéro-médiale avec lâchage de la fixation (flèche) de la prothèse en ePTFE, 2 mois après la réparation initiale (CHU de Strasbourg, France).

Figure 1.9 : Méthode 1 : Estimation en 2D de la surface d'une coupole diaphragmatique.

Figure 1.10 : Méthode 2 : Mesures pour le calcul de la surface d'une coupole diaphragmatique (a=grand rayon, b=petit rayon).

Figure 1.11 : Modèle biomécanique de la structure du diaphragme basé sur la méthode des éléments finis en utilisant des données issues des images CT scan : visualisation de la géométrie complexe du diaphragme. ²⁴

Figures 2.1 : Vues macroscopiques des deux faces du Gore Tex Dual Mesh®.

Figure 2.2 : Principe de la technique de dessiccation par contournement du point critique. 1 : déshydratation par la méthode du point critique ; 2 : déshydratation par lyophilisation.

Figure 2.3 : Aspects microscopiques des deux faces du biomatériau Gore Tex Dual Mesh® (MEB).

Figure 2.4 : Observation en microscopie photonique d'une tranche provenant d'un échec de prothèse de ePTFE implantée pendant plusieurs mois chez l'homme (bord gauche : face orientée vers le thorax ; bord droit : face orientée vers l'abdomen). L'intérieur du biomatériau apparaît poreux (parenthèse). Le matériel biologique déposé est fortement coloré (étoiles). La face rugueuse présente une structure macroporeuse (flèche). Bleu de toluidine, 10 x.

Figure 2.5 : Culture cellulaire de fibroblastes humains primaires sur du verre (témoin). MEB.

Figure 2.6 : Amas cellulaires posés à la surface de la face lisse du ePTFE. Insert : absence de protrusions cytoplasmiques. Les cellules ne semblent pas adhérer au substrat. MEB.

Figure 2.7 : Tapis cellulaire confluent recouvrant une bande lisse de la face rugueuse du ePTFE. Présence de protrusions cellulaires. MEB.

Figure 2.8 : Fibroblastes disséminés au niveau d'une bande rugueuse de la face rugueuse. MEB.

Figure 2.9 : Zone de transition entre bande lisse et bande rugueuse. Les éléments cellulaires « pontent » cette zone de transition (flèche). MEB.

Figure 2.10 : Fibroblaste humain primaire posé à la surface du ePTFE. MET.

Figure 2.11 : Fibroblaste humain primaire posé à la surface du ePTFE : prédominance de chromatine décondensée (euchromatine) à l'intérieur du noyau. MET.

Figure 2.12 : 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.

Figure 2.13.1 : Au sein du matériel biologique recouvrant la face rugueuse (explant n°1, zone A), visualisation d'un fin réseau fibrillaire (flèche) ou de faisceaux de fibres (double flèche). MEB.

Figure 2.13.2 : Matériel biologique épars visible à la surface de la face lisse de l'explant (explant n°2, zone A). Insert : prolongements cellulaires à la surface du ePTFE. MEB.

Figure 2.14.1 : Présence de cellules au sein d'une MEC bien développée à la surface de l'explant (I) (explant n°1, zone A). MET.

Figure 2.14.2 : Visualisation de fibres de collagène (flèche) s'enfonçant à l'intérieur de la structure poreuse de l'implant en ePTFE (I) (explant n°1, zone A). MET.

Figure 2.14.3 : Tapis de MEC recouvrant totalement la surface de l'explant avec, en plus fort grossissement (insert), visualisation d'épais faisceaux de fibres de collagène (étoiles) (explant n°2, zone A). MEB.

Figure 2.14.4 : Important réseau fibrillaire recouvrant toute la surface de l'explant (explant n°2, zone A). MEB.

Figure 2.15.1 : Contact direct entre une cellule et la structure poreuse du ePTFE (I) (explant n°1, zone B). MET.

Figure 2.15.2 : Raréfaction de la MEC, malgré la présence de cellules à l'intérieur du biomatériau poreux, en comparaison avec la zone centrale A (explant n°1, zone B). MET.

Figure 2.15.3 : Peu de fibres de collagène sont visibles au sein de la MEC recouvrant le ePTFE (explant n°1, zone B). Flèche = hématie. MEB.

Figure 2.15.4 : On note une nette diminution de la MEC synthétisée à la surface de la face rugueuse de l'explant dans la zone avec lâchage en comparaison avec la zone centrale (explant n°2, zone C). On remarque aussi que la réponse biologique « évite » les surfaces plus lisses (flèches) des « nœuds » du ePTFE. MEB.

Figure 2.16 : À proximité d'un point de suture on observe un décollement du tapis conjonctif nouvellement synthétisé, et faiblement fixé, à la surface de la face lisse du ePTFE (explant n°2, zone C). MEB.

Figure 2.17 : Vue sagittale en profondeur de la prothèse avec le tissu conjonctif nouvellement synthétisé à sa surface. Des cellules sont observées à l'intérieur de la structure poreuse du ePTFE (flèche). I = implant, C = matériel cellulaire. (explant n°1, zone A). MET.

Figure 2.18 : Des modifications structurales du tissu conjonctif néoformé sont apparentes dans la zone périphérique C. Des faisceaux de fibres de collagène (flèche) sont orientés parallèlement aux forces de

traction exercées par les points de fixation de la prothèse (a : explant n°1 ; b : explant n°2 ; zone C).
MEB.

Figures 3.1 : Formation d'agrégats et de films de PDA (PDA S/L) à la surface du ePTFE immergé dans une solution de dopamine (pH 8,5) sous agitation mécanique continue.

Figures 3.2 : Formation d'un film de PDA à l'interface air/eau et son transfert à la surface d'un substrat (ePTFE par exemple) par la technique de Langmuir-Schaeffer.

Figure 3.3 : Mesure de la tension interfaciale (γ) en fonction du temps de réaction au cours de la formation du film PDA A/E (tensiomètre à goutte).⁷⁸ La dopamine est dissoute à 10,6 mM dans du tampon Tris 50 mM à pH = 8,5.

Figure 3.4 : Evolution dans le temps de fissures à la surface du film PDA A/E (4h30 et 6h30 de réaction) en microscopie à réflexion.⁷⁸

Figures 3.5 : Angles de contact statiques mesurés pour le ePTFE vierge, le PTFE PDA S/L et le PTFE PDA A/E. Le liquide déposé consiste en 3 μ L d'eau distillée ultrapure.

Figure 3.6.1 : Surface poreuse du ePTFE microstructuré vierge en MEB, montrant la structure fibrillaire parsemée de nœuds.

Figure 3.6.2 : PTFE PDA S/L en MEB. La PDA enrobe les fibres de PTFE. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

Figure 3.6.3 : PTFE PDA A/E en MEB. Les fissures dans le film de PDA transféré laissent entrevoir la structure poreuse du ePTFE sous-jacent. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

Figure 3.6.4 : À plus fort grossissement, en MEB, on vérifie l'aspect granulaire du film de PDA déposé sur le PTFE PDA A/E.

Figure 3.7.1 : Image topographique obtenue par AFM de la surface du PTFE PDA S/L. Les fibrilles de PTFE enrobées de particules de PDA sont clairement identifiables.

Figure 3.7.2 : Image topographique obtenue par AFM de la surface du PTFE PDA A/E. Le biomatériau est recouvert d'un mince film granulaire de PDA.

Figure 3.7.3 : La coupe transversale du PTFE PDA A/E déposé sur du ePTFE démontre que ce biomatériau poreux est recouvert d'un film de PDA mesurant entre 60 et 80 nm d'épaisseur (MET).

Figure 3.8.1 : Micrographie de MEB montrant les hétérogénéités de la surface du ePTFE. Étoiles = nœuds interfibrillaires.

Figure 3.8.2 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du ePTFE vierge (n=20).

Figure 3.8.3 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du PTFE PDA S/L (n=14).

Figure 3.8.4 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du PTFE PDA A/E (n=33).

Figure 3.9 : Micrographe de MET montrant un fibroblaste à la surface du ePTFE PDA S/L.

Figure 3.10.1 : Micrographie de ESEM montrant une cellule souche de la gelée de Wharton (WJ-SC) à la surface du ePTFE vierge.

Figure 3.10.2 : Micrographie de ESEM d'une cellule WJ-SC à la surface du PTFE PDA S/L. Noter l'étalement de la cellule à la surface du ePTFE fonctionnalisé.

Figure 3.11.1 : Micrographie de MET montrant une cellule fibroblastique en étroit contact avec le film PDA A/E recouvrant du ePTFE.

Figure 3.11.2 : Vue du tapis cellulaire en contact avec le film de PDA A/E. **Insert** : image AFM de « hauteur » de deux fibres de collagène synthétisées par des fibroblastes recouvrant le PTFE PDA A/E.

Figure 3.11.3 : Micrographie de MET montrant de nombreux points de contact focaux entre les fibroblastes primaires et le film PDA A/E.

Figure 3.11.4 : Micrographie de ESEM d'une cellule de la gelée de Wharton (WJ-SC) étalée préférentiellement à la surface du film intacte de PDA A/E. Les flèches marquent des filopodes de la WJ-SC en direction d'une autre zone fonctionnalisée par le film de PDA (étoiles).

Figure 4.1 : Méthode de fixation d'une éprouvette pour l'essai de traction uni-axiale (étoiles : point de colle).

Figure 4.2 : Exemple de courbe de contrainte σ / déformation ε ingénieure et calcul du module de Young (σ/ε) d'un tissu biologique.⁸³

Figures 4.3 : a) Orientation des fibres de collagène dans la partie tendineuse du diaphragme de porc b) Découpe des éprouvettes dans le centre tendineux d'un diaphragme frais de porc adulte.

Figure 4.4 : Courbes de contrainte/déformation ingénierie de différentes éprouvettes de la partie tendineuse du diaphragme de porc.

Figure 4.5 : Préparation des éprouvettes de ePTFE en fonction de l'orientation des bandes sur la face rugueuse (flèche : axe parallèle aux bandes rugueuses) : *groupe 01*: perpendiculaire à l'axe (90°) ; *groupe 02* : parallèle à l'axe (0°).

Figure 4.6 : Courbes de contrainte/déformation ingénierie du ePTFE en fonction de l'orientation des bandes à la surface de sa face rugueuse (groupe 01 : bleu ; groupe 02 : vert).

Figure 4.7 : Comparaison des courbes de contrainte/déformation ingénierie des diaphragmes de porc (rouge) et du ePTFE (bleu).

Figure 4.8.1 : Face lisse du Gore Tex Dual Mesh® après traction uni-axiale (flèche : axe d'étirement) (MEB).

Figure 4.8.2 : Bande lisse de la face rugueuse du Gore Tex Dual Mesh® soumis à un étirement uni-axiale (MEB). L'agrandissement de la figure de droite montre l'alignement des fibres de ePTFE.

Figure 4.8.3 : Bande rugueuse de la face rugueuse du Gore Tex Dual Mesh® après traction uni-axiale (MEB). 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 4.9 : Système de maintien de l'échantillon dans la chambre de mise sous pression.

Figure 4.10 : Exemple d'un échantillon moucheté (rouille mélangée à du graphite) maintenu dans la chambre de mise sous pression.

Figures 4.11 : Test de gonflement à l'eau avec rétroéclairage (à travers le plexyglass) et les deux caméras en face permettant l'acquisition d'images et reliées au logiciel Vic Snap.

Figures 4.12 : Analyse d'image avec le logiciel Vic3D : vue en 3D avec gradient de couleurs traduisant les courbes de niveaux d'altitude de l'échantillon soumis au test de gonflement.

Figures 4.13 : Système de stéréo-corrélation d'images : les 2 caméras permettent de construire une image en 3D.

Figure 4.14 : Exemple de synchronisation des mesures de pression et de déplacement suivant l'axe Z (éprouvette n°3).

Figures 4.15 : a) Schéma de principe d'un dispositif d'électrofilage : un champ électrique est appliqué à un polymère en solution dans une seringue, qui va être éjecté sous la forme de filament continu collecté de façon aléatoire sur la cible (collector) b) Appareil d'électrofilage du LPMT.⁹¹

Figures 4.16 : Micrographies de MEB d'une membrane résultant de l'électrofilage de PA-6 (durée 6 heures) (figure haut – gauche). Noter la structure en plusieurs couches (figure bas – gauche). L'agrandissement de la figure de droite montre la disposition aléatoire des nanofibres.

Figure 4.17 : Courbes de contrainte/déformation ingénierie des membranes de PA-6 pour différentes durées d'électrofilage (PA-01 : 30 min, en bleu ; PA-02 : 60 min, en vert) comparées à la courbe obtenue pour le tendon (en rouge).

Figure 4.18 : Orientation aléatoire des nanofibres de PU (MEB, Low vacuum).

Figure 4.19 : Courbes de contrainte/déformation ingénierie du PU en fonction du temps d'électrofilage (PU-01 : rouge ; PU-02 : bleu).

Figures 4.20 : a) Première méthode de fabrication d'une membrane bicouche ; b) Vue de la face fibrillaire du matériau composite montrant les nanofibres de PU « noyées » dans la couche de silicone (MEB, Low vacuum).

Figures 4.21 : a) Deuxième méthode d'élaboration d'une membrane bicouche ; b) Vue de la tranche de section de cet implant montrant les deux faces bien distinctes (MEB).

Figure 4.22 : Courbes de contrainte/déformation ingénierie du ES-DF pour différentes durées d'électrofilage (ES-DF-01 : 30 min, en jaune ; ES-DF-02 : 60 min, en bleu).

Figure 4.23 : Comparaison des courbes de contrainte/déformation ingénierie pour le centre tendineux du diaphragme (rouge), le ePTFE (bleu), le PU (jaune) et le ES-DF (vert).

Figure 4.24 : a) Dispositif d'étirement uni-axial placé dans le MEB ; b) Trois échantillons de PU montés entre les mors parallèles (longueur initiale : 7 mm ; largeur : 5 mm).

Figure 4.25 : Comparaison en MEB du ePTFE, du PU et du ES-DF soumis à des étirements de 50 et 100% (MEB, 1000x, Low vacuum).

Liste des tableaux

Tableau I : Revue de la littérature des différents biomatériaux utilisés pour le remplacement diaphragmatique chez l'homme et des taux de récurrence herniaire rapportés.

Tableau II : Mesures des modules de Young du ePTFE et des 3 zones de l'explant n°1 (A : centre ; B : pas de lâchage ; C : lâchage).

Tableau III : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du ePTFE (groupe 01 : 90° ; groupe 02 : 0°).

Tableau IV : Conditions d'électrofilage définies pour le PA-6.⁹¹

Tableau V : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du PA-6 électrofilé (PA-01 : 30 min ; PA-02 : 60 min).

Tableau VI : Conditions d'électrofilage retenues pour le PU.

Tableau VII : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du PU électrofilé (PU-01 : 30 min ; PU-02 : 60 min).

Tableau VIII : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du ES-DF (ES-DF-01 : 30 min ; ES-DF-02 : 60 min).

Introduction générale

Introduction générale

La hernie diaphragmatique congénitale (HDC) est une maladie congénitale rare. Elle est caractérisée par l'absence d'une partie ou de la totalité du diaphragme, entraînant l'issue des organes abdominaux dans le thorax. Le traitement des HDC à large défaut consiste à fermer l'orifice pathologique avec une membrane prothétique. Bien que le geste chirurgical soit maîtrisé et que le remplacement diaphragmatique soit efficace, on note malheureusement un taux de récurrence de l'ordre de 50%. Et c'est dans le but de réduire le nombre de ces échecs implantaires que nous avons entrepris de caractériser et d'optimiser des biomatériaux employés pour le traitement de la HDC à large défaut.

Après avoir procédé à une revue de la littérature sur les aspects anatomiques, cliniques et prothétiques de la HDC, inventaire détaillé dans le premier chapitre, nous avons conduit des travaux de caractérisation et d'optimisation du biomatériau le plus utilisé actuellement (dans plus de 80 % des cas), à savoir le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE), un matériau synthétique non-dégradable.

Les différents axes d'investigations menés sur les prothèses en ePTFE visent à :

- ✓ Acquérir une meilleure connaissance de la réponse de l'hôte suite au traitement d'une HDC avec du ePTFE, et notamment des tissus néoformés au contact de la prothèse.
- ✓ Caractériser les propriétés mécaniques des membranes en ePTFE employées dans l'indication des HDC.
- ✓ Optimiser l'intégration tissulaire de l'implant en ePTFE par des techniques de fonctionnalisation du biomatériau.

Comme la plupart des récurrences herniaires résultent d'un « lâchage » de la prothèse en ePTFE, nous avons aussi entrepris de définir un cahier des charges précis pour des implants destinés à être utilisés dans le contexte de la HDC.

La définition des critères à remplir par les biomatériaux mis en œuvre dans le traitement de la HDC repose sur deux études :

- ✓ La détermination du taux de croissance du diaphragme humain entre le plus jeune âge et l'adolescence.
- ✓ La caractérisation des propriétés mécaniques du diaphragme de porc.

Enfin, dans un dernier volet, nous exposons les résultats de travaux ambitionnant la mise au point, sur la base du cahier des charges établi, d'un nouveau biomatériau qui permettrait de diminuer le nombre des récidives herniaires.

Chapitre 1 : Aspects anatomiques, cliniques et prothétiques de la HDC

Aspects anatomiques, cliniques et prothétiques de la HDC

I) 1) La hernie diaphragmatique congénitale (HDC)

- I) 1) a) Epidémiologie
- I) 1) b) Classification
- I) 1) c) Prise en charge prénatale
- I) 1) d) Prise en charge néonatale

I) 2) Le traitement chirurgical des HDC

- I) 2) a) Techniques chirurgicales
 - I) 2) a) 1. La laparotomie sous-costale
 - I) 2) a) 2. La thoracotomie latérale
 - I) 2) a) 3. Les approches mini-invasives (laparoscopie et thoracoscopie)
- I) 2) b) Les HDC à large défaut
- I) 2) c) Les complications : focus sur la récurrence herniaire

I) 3) Revue de la littérature des prothèses diaphragmatiques

- I) 3) a) Les prothèses synthétiques non résorbables
- I) 3) b) Les prothèses naturelles résorbables
- I) 3) c) Les prothèses naturelles et synthétiques résorbables
- I) 3) d) Les biomatériaux au stade d'expérimentation animale

I) 4) Etude anatomique de la croissance diaphragmatique normale

- I) 4) a) Objectifs
- I) 4) b) Méthodologie
- I) 4) c) Résultats

I) 1) La hernie diaphragmatique congénitale (HDC)

I) 1) a) Epidémiologie

La hernie diaphragmatique congénitale (HDC) est une maladie congénitale rare. Elle est caractérisée par un orifice diaphragmatique malformatif qui se traduit par une absence partielle ou complète d'une partie ou de la totalité du diaphragme, et qui résulte d'un défaut de fermeture du canal pleuro-péritonéal. Ceci va entraîner l'ascension des viscères abdominaux dans le thorax (**Figure 1.1**), mais également une hypoplasie des voies aériennes avec une anomalie du développement vasculaire pulmonaire à l'origine d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) secondaire.

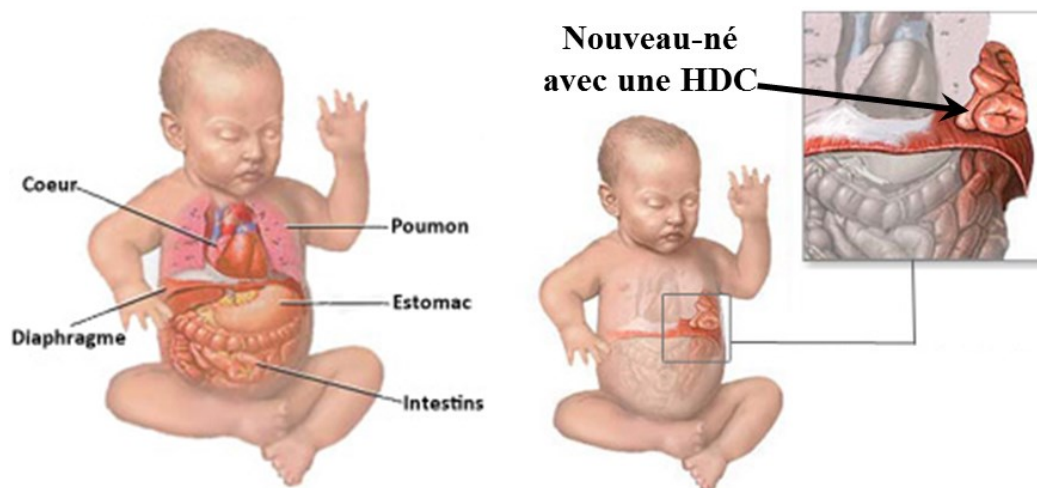


Figure 1.1 : Illustration d'une HDC gauche chez un nouveau-né avec ascension des viscères abdominaux dans le thorax (<https://ufhealth.org/diaphragmatic-hernia#Photo>).

La HDC est une maladie congénitale rare dont la prévalence est de 1/2500 à 1/4000 naissances vivantes,¹ mais cela n'inclut pas la mortalité prénatale (fausses couches, morts *in utero* et interruptions médicales de grossesse) ni les cas de morts néonatales précoces non étiquetées.² On estime ainsi que la HDC concerne environ 1/1500 grossesse.³ La HDC survient de façon homogène à travers le monde avec, par exemple, 158 cas répertoriés en France en 2011.² Malgré les progrès du diagnostic prénatal, le développement d'une chirurgie *in utero* et l'amélioration des soins néonataux, le taux de mortalité

après la naissance reste encore élevé, entre 30 et 40 %.^{1,2} Elle peut toucher les deux côtés, mais est plus fréquente à gauche (87%) qu'à droite.² De rares formes bilatérales existent également dans 1% des cas avec un mauvais pronostic.

Un registre de population collecte de façon prospective depuis 2007 tous les nouveaux cas de HDC diagnostiqués dans les 34 centres hospitaliers nationaux ; ce registre est coordonné par le Centre de Référence Maladie Rare « Hernie Diaphragmatique Congénitale » qui est basé à Marseille (Pr Benachi - Paris, Pr Storme - Lille, Dr Boubnova - Marseille). Ce centre a pour but d'organiser la prise en charge anténatale, néonatale et le suivi postnatal, et d'essayer d'améliorer les pratiques cliniques en émettant des recommandations.²

I) 1) b) Classification

Les HDC peuvent être classées en considérant 3 critères : un critère embryologique, un critère chronologique (délai de révélation de la HDC) ou un critère anatomique (taille de l'orifice).

Le diaphragme se forme chez l'embryon entre la 4^e et la 10^e semaine d'aménorrhée (SA). Initialement le diaphragme primitif se constitue ventralement par le septum transverse tandis que les membranes pleuro-péritonéales ferment dorsalement les canaux pleuro-péritonéaux. Des cellules musculaires colonisent ensuite cette membrane d'avant en arrière. Aussi la hernie dite de Bochdalek, qui représente 90% des anomalies diaphragmatiques fœtales et qui correspondrait à une anomalie de fermeture des canaux pleuro-péritonéaux, a un siège postéro-latéral, tandis que lorsque le défaut est rétro-sternal, on parle de hernie de Morgagni. L'éventration diaphragmatique, qui n'est pas une véritable hernie, correspond à une simple élévation de la coupole diaphragmatique avec compression pulmonaire. À noter que l'origine du défaut diaphragmatique est probablement un défaut de la fermeture du diaphragme, mais une origine primitive pulmonaire est également évoquée.³

Lorsque l'on considère le délai de révélation, deux types de HDC se distinguent :

- les HDC à révélation précoce, néonatale qui présentent un pronostic plus réservé du fait de l'hypoplasie pulmonaire associée et de l'HTAP. Elle est symptomatique dès la naissance de l'enfant ;
- les HDC à révélation tardive (3%), avec un pronostic plus favorable, en raison d'une diminution du risque de complication pulmonaire associée et un taux de survie de 100%.¹

Ces HDC peuvent également être classées en fonction de la taille de l'orifice diaphragmatique. En effet, parmi de nombreuses variables analysées, la taille du défaut a été définie comme le critère ayant l'impact le plus important sur la survie. Ainsi, une classification du défaut pendant l'intervention chirurgicale a été définie (**Figure 1.2**), à laquelle adhère le centre de référence des hernies diaphragmatiques en France. La taille du défaut est donc définie en 4 types (A-D), où « A » correspond à un petit défaut et « D », à une agénésie complète de la coupole diaphragmatique.⁴

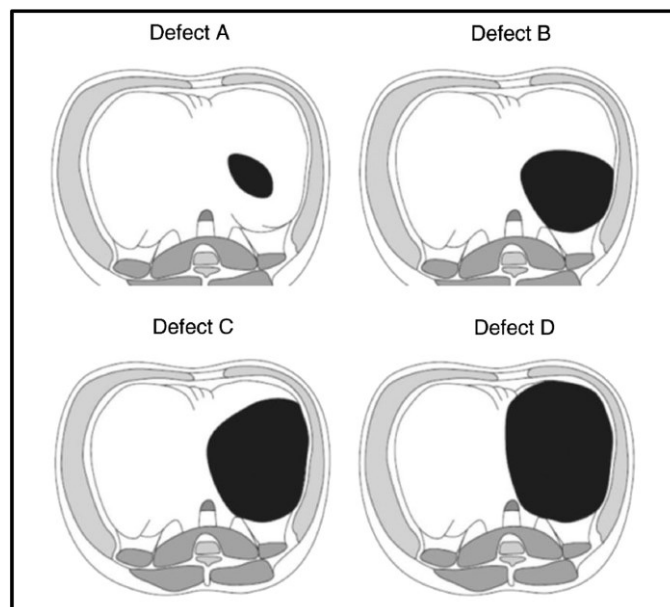


Figure 1.2 : Système de classification des HDC en fonction de la taille du défaut diaphragmatique selon « The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry ».⁴

I) 1) c) Prise en charge prénatale

Les programmes de dépistage anténataux par échographie ont permis de diagnostiquer la HDC dans la période prénatale dans environ 2 cas sur 3.⁵ Le diagnostic est le plus souvent établi lors de l'échographie du 2^e trimestre, mais est possible dans certains cas dès le premier trimestre. Le diagnostic prénatal permet également de rechercher des anomalies associées et d'établir un pronostic.

Des tentatives d'interventions prénatales ont vu le jour dans les années 1990 sous la forme de réparation du diaphragme *in utero* par chirurgie ouverte mais avec une morbidité maternelle conséquente. Actuellement se développe la stratégie basée sur la stimulation de la croissance pulmonaire fœtale par occlusion trachéale, plutôt que la réparation de l'anomalie diaphragmatique elle-même. Après un temps d'expérimentation sur modèles animaux⁶, l'occlusion trachéale a été réalisée chez l'humain, de façon de moins en moins invasive au fur et à mesure des progrès. Le geste est réalisé dans les cas de HDC sévères entre 27 et 30 SA, et l'occlusion trachéale est idéalement levée vers 34 SA par une seconde fœtoscopie ou par une ponction écho-guidée à l'aiguille. La complication principale de cette technique d'occlusion trachéale par voie endoscopique est la rupture prématurée des membranes et la prématurité induite. Cette technique de la pose d'un ballonnet intra-trachéal *in utero* par fœtoscopie fait actuellement l'objet d'un essai randomisé (FETO) pour les hernies diaphragmatiques gauches. La technique peut également être proposée dans des formes de hernie diaphragmatique droite, mais hors essai.

Il s'agit de grossesses à risque d'accouchement prématuré et elles doivent être suivies en conséquence. L'accouchement doit se dérouler dans un centre de niveau III avec une équipe de réanimation et de chirurgie pédiatrique. Un accouchement par voie basse ne présente pas de difficultés particulières.

I) 1) d) Prise en charge néonatale

Il est loin le temps où la HDC était considérée comme une urgence chirurgicale qui nécessitait un geste dans les premières heures de vie. Dans la plupart des centres, on planifie l'intervention dès que la poussée d'HTAP est en grande partie maîtrisée. La période d'adaptation après la naissance permet ainsi d'obtenir une stabilisation cardiorespiratoire.^{4, 7-8}

La décision quant au moment optimal pour la chirurgie doit être débattue au sein d'une équipe multidisciplinaire et doit tenir compte de l'état de stabilité de l'enfant, de sa capacité à tolérer une ventilation douce avec une pression d'insufflation faible, et de valeurs de gaz sanguins acceptables. Le recours à une technique de ventilation plus invasive comme l'ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) nécessite souvent de retarder le geste chirurgical, car celui-ci devient beaucoup plus risqué du fait d'une anti-coagulation importante.³ Par ailleurs, l'apparition de signes de souffrance des anses herniées en intra-thoracique est une indication pour avancer le moment de l'intervention chirurgicale, afin d'éviter les complications générales et septiques liées à la perforation digestive.

En dehors des mesures de réanimation en période néonatale permettant de stabiliser le nouveau-né, le traitement de la HDC est un traitement chirurgical visant à réduire le contenu de la hernie et à réparer le défaut diaphragmatique afin de limiter les complications pulmonaires engendrées ainsi que les complications liées à l'étranglement des anses digestives herniées.

I) 2) Le traitement chirurgical des HDC

I) 2) a) Techniques chirurgicales

Plusieurs techniques et voies d'abord sont possibles pour le traitement chirurgical d'une HDC.

I) 2) a) 1. La laparotomie sous-costale

C'est certainement la voie d'abord la plus utilisée. Les avantages sont une bonne visualisation des berges de la hernie, la possibilité de réaliser un geste anti-reflux dans le même temps opératoire, l'appréciation d'un éventuel trouble de la rotation digestive et son traitement.⁸ L'incision est réalisée en sous-costal gauche pour une HDC gauche ou à droite pour une HDC droite. La voie médiane sus-ombilicale peut aussi être utilisée notamment dans le traitement de la hernie de Morgagni. La première étape consiste à faire l'inventaire des viscères abdominaux herniés. Ensuite, la réduction herniaire se fait par une manipulation manuelle douce, surtout pour le foie qui présente une grande fragilité (**Figure 1.3**). Le bilan lésionnel est complété : existence d'un sac herniaire qui sera réséqué, évaluation du degré d'hypoplasie pulmonaire, existence d'une séquestration pulmonaire associée qui sera excisée, présence d'une malrotation intestinale dont le traitement consistera en la mise en mésentère commun complet, etc. Après libération des berges diaphragmatiques, il s'agira d'évaluer la faisabilité de la fermeture diaphragmatique : idéalement la fermeture primaire est privilégiée (lorsque le défaut est de petite taille) et elle se fait par des points séparés de fil non résorbable (**Figure 1.4**). Parfois ces points peuvent être appuyés sur des supports (« pledget ») ou encore passés sur le périoste costal (« rib-anchoring stitches ») pour renforcer la suture. Lorsque le défaut est de grande taille (Type C) ou s'il existe une agénésie complète de la coupole (Type D), le remplacement diaphragmatique est nécessaire, soit avec un lambeau musculaire, soit plus fréquemment avec un implant prothétique (**Figure 1.5**). Le geste se termine par la fermeture pariétale qui peut être différée s'il existe une tension intra-abdominale excessive après réintégration des viscères et du fait également d'une croissance modeste de la paroi abdominale, déshabillée pendant la grossesse.

I) 2) a) 2. La thoracotomie latérale

Cette voie d'abord est particulièrement indiquée pour les HDC droite, mais ne permettra pas d'explorer l'étage digestif, ni de bien libérer les berges diaphragmatiques.

I) 2) a) 3. Les approches mini-invasives (laparoscopie et thoracoscopie)

Les étapes de la chirurgie sont les mêmes. La réduction herniaire se fera grâce à des pinces de coelioscopie atraumatiques. Tout comme en chirurgie ouverte, le défaut sera fermé avec des points séparés de fil non résorbable. Si un remplacement prothétique est indiqué, il ne faudra pas hésiter à convertir. La thoracoscopie est plus utilisée dans cette indication que la laparoscopie, mais elle pose le problème de la stabilité ventilatoire du fait de la nécessité de placer l'enfant en décubitus latéral, comprimant le poumon le moins atteint par l'hypoplasie, et le problème de l'insufflation intra-thoracique qui peut être mal tolérée. La laparoscopie pose le problème de l'espace de travail très réduit après réintroduction des organes dans l'abdomen. Ces approches mini-invasives se sont très largement développées ces dernières années et présentent un certain nombre d'avantages (diminution de la douleur, moins de sédation et d'analgésie post-opératoire, alimentation plus précoce, bénéfice cosmétique...). Les indications doivent cependant être discutées au cas par cas, et concernent principalement des enfants avec une hypoplasie pulmonaire moindre et un défaut diaphragmatique de plus petite taille, réparable sans prothèse.

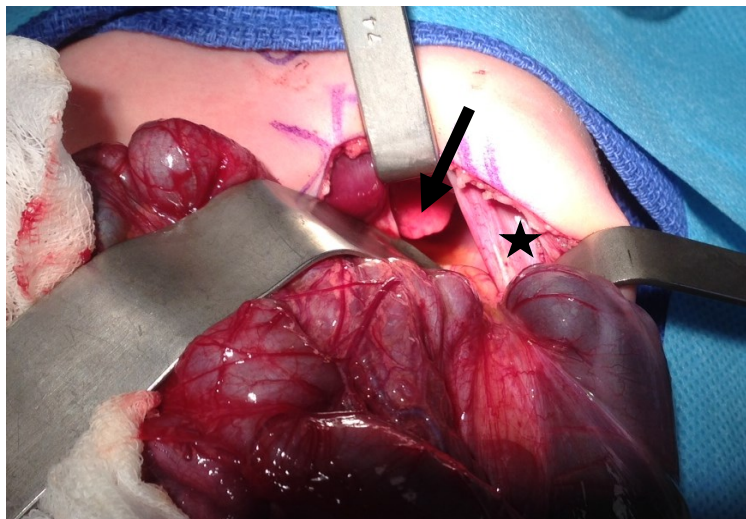


Figure 1.3 : Vue peropératoire d'une hernie diaphragmatique gauche, abordée par laparotomie, après réduction des organes herniés ; la berge diaphragmatique (étoile) est réclinée afin de visualiser le moignon pulmonaire (flèche) (CHU de Strasbourg, France).

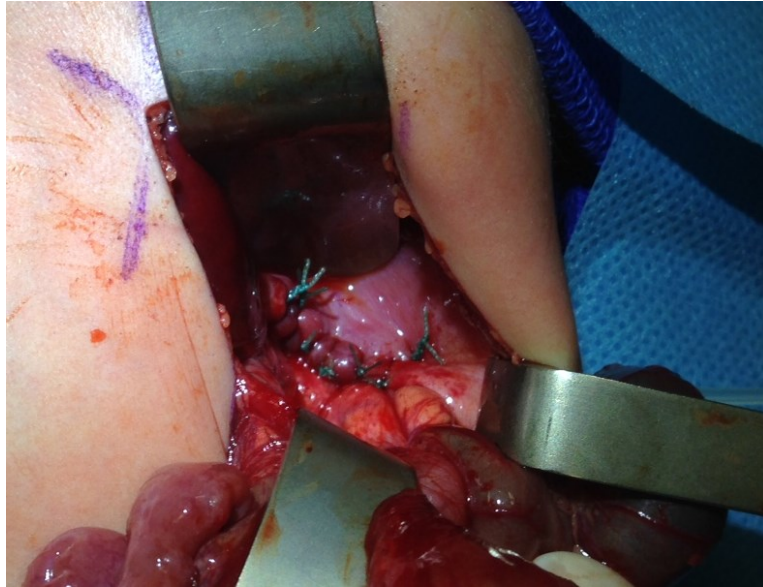


Figure 1.4 : Hernie diaphragmatique gauche après fermeture du défaut (Type B) par des points de suture entre les berges diaphragmatiques (CHU de Strasbourg, France).



Figure 1.5 : Hernie diaphragmatique gauche (Type C) avec remplacement diaphragmatique par une prothèse (5 x 6,5 cm) de type ePTFE (CHU de Strasbourg, France).

I) 2) b) Les HDC à large défaut

Une simple réparation du diaphragme par des points de suture n'est pas toujours possible. La définition d'une HDC à large défaut n'est pas claire : on peut la définir comme une hernie avec un défaut de plus de 50% de la coupole diaphragmatique manquante.⁹ Ceci correspond aux types C et D du système de classification proposé précédemment (**Figure 1.2**). Selon les données du « Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry » incluant 1350 patients sur une période de 4 ans, les types C et D correspondent à 46% des HDC enregistrées,⁴ 48% pour la cohorte nationale pour l'année 2011.²

Dans la pratique courante, il est communément reconnu qu'il faudra avoir recours à un remplacement diaphragmatique en présence d'une tension trop excessive pour permettre une simple réparation, d'un défaut de grande taille ou d'une agénésie diaphragmatique. Ce remplacement peut être réalisé soit en utilisant des lambeaux musculaires, soit en utilisant des implants prothétiques.

Les lambeaux musculaires étaient utilisés avant la commercialisation des prothèses. Ils sont issus soit du muscle grand dorsal inversé,¹⁰ soit de la paroi abdominale antérieure en utilisant le muscle oblique interne et le muscle transverse.¹¹ Leur avantage principal est que ces lambeaux gardent leur vascularisation propre et vont donc grandir avec l'enfant ce qui peut permettre de réduire le taux de récurrence.¹² Mais l'utilisation de ces lambeaux peut entraîner des complications esthétiques avec une voussure musculaire abdominale, sans réelle éventration. Néanmoins, les études ne montrent pas de bénéfice statistiquement significatif par rapport aux prothèses, en termes de déformations thoracique et rachidienne, ou encore de mortalité.¹³ Certains auteurs ont démontré un risque de récurrence significativement inférieur avec le lambeau musculaire vs le patch.¹² Comme il s'agit de techniques chirurgicales plus longues et plus compliquées, l'indication principale des lambeaux musculaires est la récurrence de HDC après échec d'un remplacement prothétique initial.¹¹

Un implant prothétique sera nécessaire chez plus de 50% des patients.^{4, 14-15} Techniquement, cet implant sera fixé sur toute sa circonférence aux tissus adjacents, à savoir les berges diaphragmatiques, les côtes et parfois même sur la paroi de l'œsophage ou des gros vaisseaux. Cette fixation se fait par des points séparés ou des surjets de fil non résorbable. Il existe actuellement deux grands types de biomatériaux pour les prothèses : les matériaux non résorbables et les matériaux résorbables. Le biomatériau le plus utilisé actuellement est le ePTFE ou « Expanded polytetrafluoroethylene » (Gore-Tex® [W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ]).¹⁶ La taille exacte nécessaire au remplacement diaphragmatique varie d'un patient à un autre, et sera définie au moment de la chirurgie où le chirurgien va découper la forme correspondant au défaut. Il est coutume de découper la prothèse un peu plus large afin de construire un dôme ou une coupole diaphragmatique (**Figure 1.6**). Les différents matériaux déjà utilisés pour cette indication sont décrits dans le **Tableau I**. Le biomatériau optimal n'existe pas encore et nous discuterons ce point dans les chapitres suivants.

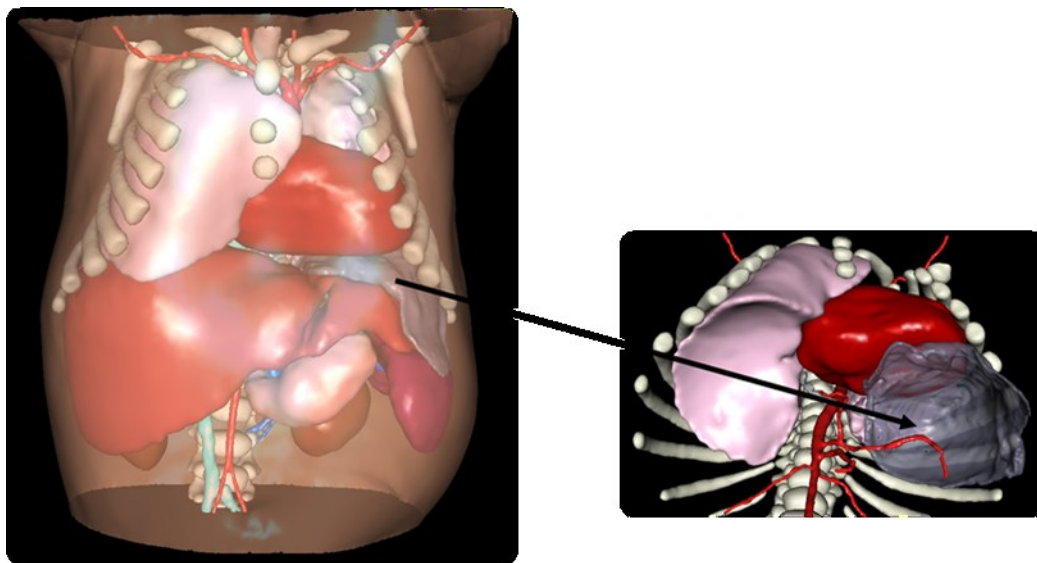


Figure 1.6 : Reconstructions scanographiques 3D montrant l'emplacement d'une prothèse diaphragmatique gauche chez un nouveau-né traité pour une HDC gauche de type D, ainsi que sa configuration sous la forme d'un dôme (Pr L.Soler, IRCAD - IHU Strasbourg, France).

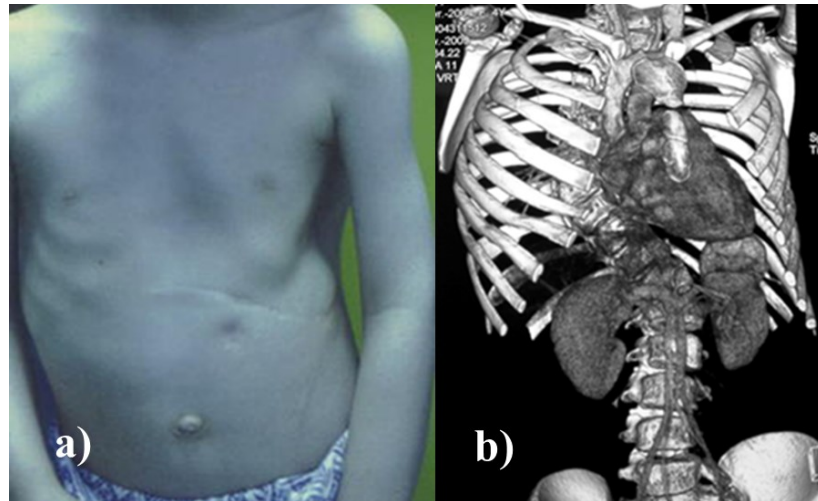
I) 2) c) Les complications : focus sur la récurrence herniaire

Un suivi à long terme est essentiel afin de dépister les complications qui peuvent être d'ordre respiratoire, nutritionnel, musculo-squelettique, gastro-intestinal ou encore neuro-psychologique.⁷ Ces complications surviennent chez 50 à 87% des enfants survivants.¹⁷ Les principaux facteurs de risque de complications sont : un large défaut diaphragmatique ou une agénésie complète, la nécessité de recourir à des techniques de ventilation plus invasives comme l'ECMO et la nécessité d'utiliser une prothèse pour la fermeture diaphragmatique.⁴

Le matériau prothétique idéal n'est pas encore disponible : soit les implants sont trop rigides, soit ils se dégradent trop rapidement ; ce qui entraîne des complications à long terme. La rigidité d'une prothèse va créer des problèmes lorsque l'enfant grandit, car l'implant prothétique ne va pas s'adapter à la croissance de la cavité thoracique. Le remplacement prothétique a été défini comme un facteur indépendant associé au risque de récurrence herniaire et de déformations rachidiennes (scoliose) et/ou thoraciques (**Figures 1.7**).¹⁸ Les propriétés mécaniques inadaptées des biomatériaux utilisés vont conduire à des tensions excessives sur les tissus de fixation, entraînant soit des déformations squelettiques, soit des détachements prothétiques. La période critique de récurrence s'étend sur les trois premières années : en effet, la moitié des patients avec prothèse vont récidiver avant trois ans.¹⁹ Il s'agit de la période où l'enfant est soumis à des pics de croissance très rapide.¹⁴ À ceci vont également s'ajouter des facteurs moteurs avec la verticalisation et l'acquisition de la marche. Pour d'autres auteurs, l'âge moyen de survenue de la récurrence se situe entre 18 et 20 mois,¹⁴ avec une cinétique en 2 temps :

- une récurrence précoce (inférieure à six mois) due à une probable erreur technique lors de la chirurgie,
- une récurrence tardive (supérieure à six mois) due à un défaut prothétique lié à la traction engendrée par la croissance naturelle de l'enfant sur un matériel rigide.

Cependant, afin de minimiser le risque de récurrence, différents aspects de la chirurgie sont à prendre en compte : le type de biomatériau, la forme et la taille de la prothèse mais aussi les fils de suture utilisés. Les fils de suture doivent être non résorbables.⁸ En effet, des sutures dégradables ont été associées à des récurrences dans un modèle animal ainsi que la fixation de la prothèse sur la partie tendineuse du diaphragme.²⁰



Figures 1.7 : a) 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 (CHU de Strasbourg, France).

Les taux de récurrence herniaire varient considérablement dans la littérature, à cause de l'hétérogénéité des populations étudiées (taille du défaut, type de chirurgie, type de biomatériaux utilisés, caractère symptomatique ou non de la récurrence, durée du suivi, etc.). Par exemple, une récente revue de la littérature trouvait une variabilité d'utilisation d'implants prothétiques allant de 15 à 84 % en fonction des centres.¹⁵ Les remplacements prothétiques ne devraient être utilisés que s'il existe une agénésie ou un défaut trop large pour réaliser une suture primaire ;²¹ pour d'autres auteurs, c'est uniquement en dernier recours.^{9, 22} Les cas avec utilisations de patchs pour des défauts moins importants auront sans doute moins de risques de récidiver. Avec les progrès réalisés en réanimation néonatale, la survie des cas les plus sévères (avec un défaut plus large) augmente. Par conséquent, la

morbidité à long terme est plus importante avec un risque associé de récurrence plus important.²² Actuellement les taux de récurrence, tous patients confondus (avec ou sans prothèse), sont de l'ordre de 13 à 15 %.^{18, 23} Cependant, si l'on ne considère que les cas nécessitant un remplacement diaphragmatique, la récurrence herniaire peut survenir chez 1 patient sur 2 (**Tableau I**).⁷ La prothèse diaphragmatique est effectivement considérée comme le principal facteur de risque indépendant de récurrence herniaire.^{19, 23}

Le plus souvent, cette récurrence sera localisée au niveau de la région postéro-médiale (**Figure 1.8**).^{9, 14} En effet, selon l'analyse d'un modèle biomécanique de reconstruction 3D de la structure du diaphragme, il s'agit là de la région soumise aux contraintes maximales.²⁴ La récurrence peut se révéler par des symptômes respiratoires (toux, wheezing...) ou gastro-intestinaux (reflux gastro-oesophagien, difficultés alimentaires, retard de croissance...) ou être complètement asymptomatique et de découverte fortuite sur une radiographie réalisée dans un but de suivi, par exemple.²² Ces récurrences peuvent se manifester également de façon plus urgente, sous la forme de hernie diaphragmatique étranglée, qui impose une sanction chirurgicale à cause des complications (syndrome occlusif, péritonite, sepsis,...), mais aussi des risques de mortalité. La morbidité de ces récurrences diaphragmatiques est liée à la nécessité de ré-intervenir, ce qui sous-entend une nouvelle anesthésie générale et une nouvelle chirurgie avec leurs risques respectifs (reprise chirurgicale plus difficile et plus invasive), une nouvelle hospitalisation (avec ses coûts et contraintes pour les parents, ainsi que ses risques en termes d'infections nosocomiales...).²⁵ Le problème de récurrence de ces HDC est un problème croissant puisque de plus en plus d'enfants avec une HDC à large défaut vont survivre à la période néonatale.



Figure 1.8 : Coupe tomodensitométrique d'une récurrence postéro-médiale avec lâchage de la fixation (flèche) de la prothèse en ePTFE, 2 mois après la réparation initiale (CHU de Strasbourg, France).

I) 3) Revue de la littérature des prothèses diaphragmatiques

Une large sélection de biomatériaux a été utilisée ces dernières années. Ils peuvent être divisés en deux groupes : les prothèses synthétiques, non résorbables et les prothèses dites « naturelles », résorbables.^{8, 26}

Ces différentes prothèses sont résumées dans le **Tableau I** qui donne également les taux de récurrences décrits dans la littérature.

I) 3) a) Les prothèses synthétiques non résorbables

La prothèse diaphragmatique utilisée le plus fréquemment de nos jours est le ePTFE, pour « Expanded polytetrafluoroethylene » (Trademark Gore-Tex® [W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ]) utilisé dans plus de 80% des cas de remplacement diaphragmatique.¹⁶ Ce type de prothèse est cependant associé à des taux de récurrence allant jusqu'à 50%. Des mesures d'amélioration ont été proposées afin de tenter de diminuer le taux de récurrence comme, par exemple, le modelage des plaques

de ePTFE afin d'obtenir une forme de cône ou de dôme ou la réalisation d'une double fixation des prothèses.²⁵ Ces prothèses avec une forme conique ont également l'avantage d'augmenter le volume abdominal et sont susceptibles de faciliter l'intégration tissulaire par la formation de plis lorsque l'on fronce la prothèse au niveau des fixations.⁸ Les auteurs rapportent les résultats sur une série de 33 patients (dont 11 prothèses coniques) avec un suivi sur un an²⁵ : ils décrivent une diminution du taux de survenue des récidives de 46% à 9%, mais sans analyse statistique. Plus récemment, une autre équipe s'est inspirée de cette technique avec une évaluation rétrospective de leur cohorte de 74 patients : une récidive est survenue dans 5% des cas sur un suivi de 2 ans.²⁷ Les caractéristiques physico-chimiques du ePTFE seront présentées ultérieurement.

Historiquement, des biomatériaux comme le Dacron® (polyethylene terephthalate) ou le Silastic® (polymeric silicone) ont d'abord été utilisés.²⁸ Ils se sont cependant avérés être de mauvais candidats au remplacement diaphragmatique avec par exemple pour le Silastic®, un matériau trop inerte, très peu de réaction inflammatoire, d'où un risque de détachement en périphérie (33% de récidives).^{13, 29}

Des prothèses composites ont également vu le jour, comme le composite PTFE-Marlex™ [CR Bard, Murray Hill, NJ]. Il est constitué de PTFE orienté vers l'abdomen pour éviter les adhérences, et de l'autre côté, de polypropylène qui a pour objectif de favoriser l'intégration tissulaire. Une étude monocentrique rétrospective a montré un taux de récidive de l'ordre de 4% dans une série de 28 patients sur un suivi de 4 ans.³⁰ Malheureusement, il existait un taux de traumatisme splénique non négligeable (17%) ayant nécessité une splénectomie. Dans une autre série de 9 patients, le taux de récidive était cependant de 22%.¹³

I) 3) b) Les prothèses naturelles résorbables

L'objectif de ces biomatériaux résorbables est de favoriser une revascularisation rapide par les tissus voisins et un remodelage dans le tissu hôte pour permettre une intégration tissulaire optimale.

Différents biomatériaux existent :

- Surgisis[®], SIS[®] [Cook Biotech Inc., Cook Deutschland GmbH, Mönchengladbach], qui est une matrice collagénique décellularisée issue de la sous-muqueuse intestinale de porc, greffée de facteurs de croissance. Ce biomatériau entraîne cependant une réaction inflammatoire majeure, du fait de la présence d'ADN de porc (matrice non totalement décellularisée), avec des conséquences pour l'homme encore inconnues.²⁶ Avec ce biomatériau utilisé seul, les récurrences surviennent de façon plus précoce, peut-être du fait d'une dégradation trop rapide en comparaison avec une régénération musculaire lente.²⁰ Certains auteurs l'ont également implanté en association avec le PTFE.¹⁹ Une méta-analyse récente a conclu à l'absence de différence significative en termes de récurrence entre le Surgisis[®] et le ePTFE.³¹
- AlloDerm[®] [Lifecell Corporation, Branchburg, NJ], qui est une matrice extracellulaire décellularisée issue du derme de cadavres humains, est moins souvent utilisé pour cette indication, parce que le produit entraîne des taux de récurrence élevés (40%) et surtout de secondes récurrences (100% des patients).³²
- Permacol[™], [Covidien, AG], qui est une matrice collagénique décellularisée issue du derme de porc avec une réticulation HDMI (Hexaméthylène diisocyanate). La réticulation permet une augmentation de la résistance à la traction. Cependant une analyse microscopique conduite chez l'animal a montré une intégration tissulaire moins importante comparée au ePTFE.⁸ Chez l'homme, ce biomatériau a été implanté chez 8 patients, sans survenue de récurrence sur un suivi de 20 mois, mais ce résultat n'a pas démontré de significativité en comparaison au ePTFE.³³
- Des tissus issus de dure-mère cadavériques ont également été proposés mais posent le problème de transmission potentielle d'encéphalopathies spongiformes comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob.³⁴⁻³⁵

I) 3) c) Les prothèses naturelles et synthétiques résorbables

Ce type de biomatériau s'est avéré décevant pour le remplacement diaphragmatique, comme par exemple le CCVM (Collagen Coated Vicryl Mesh, [Ethicon Inc., Sommerville, NJ, USA]) qui a entraîné une récurrence dans 100% des cas.^{8, 36} Bien que le Vicryl se dégrade en 60 à 90 jours *in vivo*, il ne possède plus que 20% de sa résistance à la traction après seulement 14 jours d'implantation.²⁰

I) 3) d) Les biomatériaux au stade d'expérimentation animale

Le PLGA («Poly-lactic-co-glycolic acid mesh collagen sponge hybrid scaffold») a été testé sur un modèle animal de HDC (rat). Ce biomatériau a été conçu pour être résorbé en 3 mois, et après ce délai, les auteurs n'ont pas décrit de récurrence.³⁷ Après 3 mois, ce néo-diaphragme est plus épais que dans le groupe contrôle, mais dépourvu de cellules musculaires.²⁶

Un groupe japonais a également proposé l'utilisation d'une prothèse résorbable composée d'un copolymère (acide lactique et caprolactone) renforcé de fibres d'acide polyglycolique. Ce type de prothèse se résorbe complètement en 8 semaines. Ce biomatériau a aussi été proposé dans d'autres indications comme la régénération veineuse et des canaux biliaires. Ce matériau a été testé sur un modèle porcin de HDC : il n'y a pas eu de récurrence et il existe une bonne prolifération cellulaire mésothéliale. Les auteurs suggèrent cependant d'évaluer la résistance mécanique sur des durées plus longues avant de passer à une application humaine.³⁸

D'autres auteurs ont également proposé l'utilisation d'un support biodégradable composé d'une combinaison de polycaprolactone (PCL) et de collagène de type I.³⁹ Mais ce support présente une particularité : il est composé de fibres de polymères orientées, obtenues par électrofilage du mélange PCL/collagène. Selon les auteurs, cette orientation unidirectionnelle permet de guider

l'alignement cellulaire. Dès le 4^e mois d'implantation dans un modèle de petit animal, des myofibres ont été mises en évidence, avec dès le 2^e mois, des propriétés mécaniques du biomatériau similaires à celles du diaphragme biologique.⁴⁰

Plus récemment, certains auteurs se sont intéressés aux techniques d'ingénierie tissulaire afin de remplacer le diaphragme à partir de cellules souches mésenchymateuses autologues du liquide amniotique. La question essentielle est ainsi de savoir s'il vaut mieux proposer un néo-diaphragme dont la structure serait plutôt musculaire à partir de cellules musculaires squelettiques⁴¹ ou plutôt tendineuse.⁴² Les groupes travaillant sur le sujet sont actuellement plus en faveur d'une reconstruction tendineuse que musculaire.^{14, 43} Le principal argument en défaveur d'un implant musculaire est la dysfonction qui peut être occasionnée par les problèmes d'innervation.¹⁴ Les implants actuellement testés sur un modèle de grand animal sont prometteurs mais pas encore transposables à une application clinique humaine.⁴⁴ Les points limitant de ces techniques sont la complexité de leur mise en œuvre et le risque infectieux.³⁸

	Matériau		Taux de récurrence
Synthétiques Non résorbables	Gore Tex®	Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE)	28-50% ^{9, 19, 21, 25, 31, 32, 33}
	PTFE + Marlex™	PTFE + monofilaments de polypropylène macroporeux	4-22% ^{13, 30}
Naturelles résorbables	Surgisis® (SIS)	Réseau de collagène de type I de la muqueuse intestinale acellulaire porcine + facteurs de croissance	22-68% ^{13, 19, 21, 31, 32}
	AlloDerm®	Derme cadavérique humain acellulaire non réticulé	40% ³²
	Permacol™	Collagène porcin acellulaire réticulé	Pas de récurrence ³³
	Tutoplast® Dura	Dure-mère lyophilisée	21% ³⁵

Tableau I : Revue de la littérature des différents biomatériaux utilisés pour le remplacement diaphragmatique chez l'homme et des taux de récurrence herniaire rapportés.

I) 4) Etude anatomique de la croissance diaphragmatique normale

Le diaphragme représente un des muscles principaux impliqués dans la respiration dont la physiologie et le mouvement sont très complexes. Le diaphragme est une membrane musculo-tendineuse en forme de dôme qui sépare le thorax de l'abdomen. Il est constitué d'une partie périphérique musculaire (muscle squelettique strié) qui s'insère au niveau lombaire, sternal et costal, et d'une partie centrale tendineuse.

I) 4) a) Objectifs

Le traitement par remplacement prothétique des HDC à large défaut est source de récurrence : la prothèse ne permet pas l'adaptation à la croissance de l'enfant et à la croissance de sa cavité thoracique. Afin de définir le cahier des charges de la prothèse optimale, se pose alors la question de définir la croissance diaphragmatique normale de l'enfant, de la période néonatale à l'âge adulte. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune donnée ni dans la littérature scientifique, ni dans les études anatomiques sur la croissance diaphragmatique.⁴⁵ La seule information connue est que la croissance du diaphragme est proportionnelle à la croissance de l'enfant : Rehan *et al.* a démontré, à partir d'une étude échographique chez 15 nouveaux-nés, que l'épaisseur diaphragmatique est significativement associée au poids, à la taille, et au périmètre crânien mais pas à l'âge gestationnel.⁴⁶ Une seule étude présentant des mesures du diaphragme sur des radiographies thoraciques a permis de montrer une corrélation significative entre l'âge de l'enfant et le diamètre et la hauteur diaphragmatiques.⁴⁷

Notre objectif était donc de réaliser une étude rétrospective d'imagerie de la croissance diaphragmatique de la petite enfance jusqu'à l'adolescence, afin de chiffrer cette croissance et de définir le cahier des charges de nouveaux matériaux prothétiques pour améliorer la prise en charge initiale et le devenir à long terme de ces enfants porteurs de HDC. Ainsi, nous avons réalisé une étude préliminaire d'imagerie de la croissance d'une coupole diaphragmatique dans une population d'enfants sains (non porteurs de HDC) sur la base de mesures tomodensitométriques du diaphragme.

I) 4) b) Méthodologie

Il s'agit d'une étude observationnelle, monocentrique, rétrospective. En effet, la tomodensitométrie (TDM) utilisée pour les mesures est un examen réalisé pour une toute autre indication médicale (traumatisme thoraco-abdominal, suivi de pathologie cancéreuse, pathologie cardiaque mineure par exemple), et non spécifiquement pour cette étude. Aucun examen complémentaire réalisé en plus des soins habituels et nécessaires n'est proposé par ce protocole, qui n'entraîne pas de surcoût hospitalier.

Cette étude a obtenu un avis favorable du Comité d'Ethique des Facultés de Médecine, d'Odontologie, de Pharmacie et du CHU de Strasbourg (Références : AMK/BG/2013/dossier 2013-22).

Population étudiée

Les critères d'inclusion sont :

- Deux groupes de patients : nouveaux-nés âgés de 0 à 3 ans, et adolescents âgés de 13 à 19 ans,
- Une TDM thoraco-abdominale aura été réalisée préalablement pour une toute autre raison médicale (bilan de traumatisme, bilan d'extension ou de suivi oncologique...).
- Cette population ne présente pas de pathologie pouvant influencer sur le développement normal du diaphragme (pathologies cardiaques sévères, hernie diaphragmatique, malformations pulmonaires...).

Le refus de participation de la part du sujet ou de l'un de ses parents (ou tuteurs légaux) constitue un critère de non inclusion. Les données sont recueillies de façon rétrospective sur dossier. Les dossiers sont sélectionnés parmi les patients pédiatriques qui ont passé une TDM thoraco-abdominale au sein du service de radiopédiatrie du CHU de Strasbourg et répondant aux critères d'inclusion et de non-inclusion précédemment décrits.

Techniques de traitement des images TDM

Les TDM de 17 enfants sont ainsi analysés et divisés en deux groupes selon leur âge : groupe 1 (n = 9) : âge médian : 2,0 mois (0,1 - 9,5) ; groupe 2 (n = 9) : âge médian : 182,6 mois (158,5 - 235,5).

Nous avons utilisé deux techniques de mesure de la surface diaphragmatique :

- **Méthode 1** : soit une surface estimée en 2D sur des coupes horizontales de scanner (**Figure 1.9**) ;
- **Méthode 2** : soit une surface calculée en utilisant des mesures faites sur les TDM (a = grand rayon, b = petit rayon) (**Figure 1.10**) ; la forme d'une coupole étant assimilée à un dôme (demi ellipse) et sa surface est calculée en utilisant la formule : $A = \pi b^2 + \pi ab \arcsin(e)/e$
Avec e = excentricité soit $e = (\text{racine carrée de } a^2 - b^2)/a$.

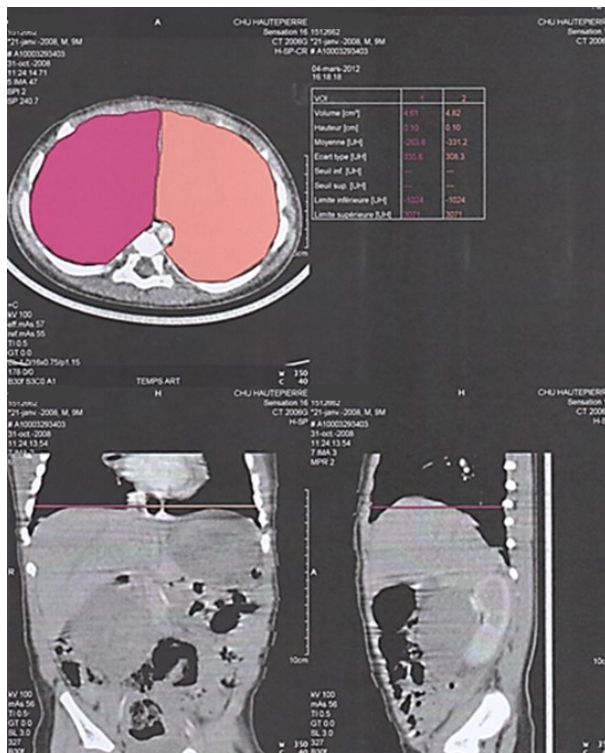
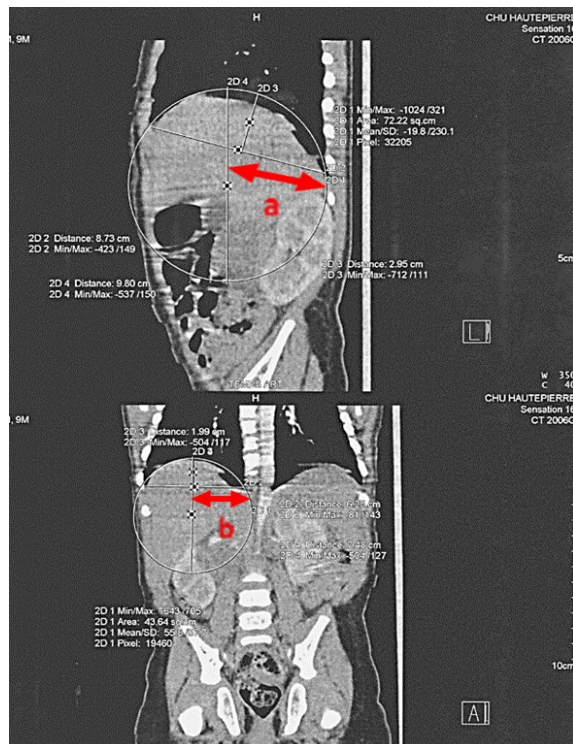


Figure 1.9 : Méthode 1 : Estimation en 2D de la surface d'une coupole diaphragmatique.



$$A = \pi b^2 + \pi a b \arcsin(e)/e$$

e = excentricité soit

$$e = (\text{racine carré de } a^2 - b^2)/a$$

Figure 1.10 : Méthode 2 : Mesures pour le calcul de la surface d'une coupole diaphragmatique (a=grand rayon, b=petit rayon).

Enfin, les 2 méthodes d'évaluation de la surface diaphragmatique sont comparées en utilisant le test de Mann-Whitney avec le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CAL, USA).

I) 4) c) Résultats

En combinant les échantillons correspondant à la même méthode et au même côté de couple diaphragmatique, nous obtenons $9 \times 9 = 81$ ratios de surface qui correspondent au facteur de croissance relatif entre les 2 groupes. Les résultats détaillés ont fait l'objet d'une publication récente.⁴⁸ Plus précisément, le ratio Groupe 2 / Groupe 1 pour la **Méthode 1** est de $4,3 \pm 0,3$ à gauche et $4,0 \pm 0,3$ à droite, et pour la **Méthode 2** : $5,1 \pm 0,5$ à gauche et $5,1 \pm 0,5$ à droite (moyenne $\pm$ ESM). Ceci signifie que la surface d'une coupole diaphragmatique est multipliée par un facteur de 4 à 5, et donc que la déformation uni-axiale peut être extrapolée à environ 100 %. Ces données sont totalement nouvelles et ont un impact majeur dans la définition du cahier des charges pour l'élaboration d'un biomatériau avec des possibilités de déformation optimales.

Bien évidemment, les deux techniques de mesures de la surface diaphragmatique que nous avons utilisées restent imparfaites. La mesure précise de cette surface est compliquée à cause de sa géométrie complexe (**Figure 1.11**) et de son inhomogénéité tissulaire.^{24, 45} De plus, il n'est pas possible de déterminer la croissance tridimensionnelle du diaphragme ni de connaître les évolutions respectives des portions musculaire et tendineuse. Cette mesure varie également à court terme à cause des mouvements liés à la respiration sous l'action des éléments musculaires du diaphragme.

Afin de préciser ces mesures, d'autres méthodes d'investigations sont à expérimenter comme, par exemple, la modélisation du diaphragme. Certains auteurs ont ainsi développé un modèle biomécanique 4D de la surface du diaphragme, avec reconstruction géométrique basée sur la méthode des éléments finis, à partir d'images scannées (4D CT-scan)²⁴ (**Figure 1.11**) : les auteurs ont ainsi pu simuler des contraintes pour obtenir des images traduisant la respiration, c'est-à-dire les différentes géométries ou positions du diaphragme. Ils ont pu notamment démontrer que les contraintes maximales, et donc les déformations maximales, sont générées sur la partie postérieure du diaphragme. Il serait certainement intéressant d'utiliser ce type d'outil pour notre application.

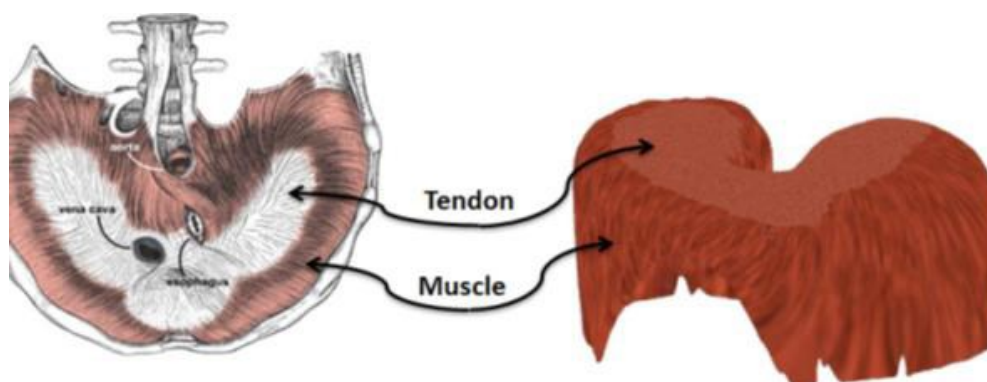


Figure 1.11 : Modèle biomécanique de la structure du diaphragme basé sur la méthode des éléments finis en utilisant des données issues des images CT-scan : visualisation de la géométrie complexe du diaphragme.²⁴

Conclusion du chapitre 1

Ce premier chapitre aura permis de poser les bases de la réflexion pour notre travail de recherche qui vise à améliorer le biomatériau majoritairement utilisé actuellement.

La prothèse diaphragmatique optimale devrait présenter les caractéristiques suivantes :

- Biocompatibilité,
- Résistance à la traction,
- Souplesse pour suivre les mouvements physiologiques de la ventilation et de la mobilisation de l'enfant,
- Inertie chimique pour éviter les réactions inflammatoires et prévenir les adhérences sur le versant abdominal,
- 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 n'est pas ou insuffisamment colonisé par les tissus adjacents, il devrait au moins tolérer un facteur de croissance surfacique de 4 à 5 (déformation uni-axiale de l'ordre de 100 %).

Le second chapitre a pour objectif de caractériser plus précisément le ePTFE, utilisé dans la majorité des cas de remplacement diaphragmatique.

Chapitre 2 : Le polytétrafluoroéthylène

Le polytétrafluoroéthylène

II) 1) Généralités sur le polytétrafluoroéthylène (PTFE)

I) 1) a) Structure et propriétés générales

II) 1) b) ePTFE en pratique clinique

II) 1) c) ePTFE utilisé en pratique clinique : analyse microscopique

II) 2) Principales méthodes de caractérisation

II) 2) a) Microscopie électronique à balayage (MEB)

II) 2) b) Microscopie électronique en transmission (MET)

II) 2) c) Microscopie à force atomique (AFM)

II) 2) d) Evaluation de la biocompatibilité

II) 2) d) 1. Culture cellulaire de fibroblastes dermiques humains

II) 2) d) 2. Culture cellulaire de cellules de la gelée de Wharton

II) 3) Caractérisation du ePTFE

II) 3) a) Caractérisation en microscopie électronique

II) 3) b) Etude *in vitro*

II) 3) c) Etude *in vivo*

II) 3) c) 1. Méthodologie

II) 3) c) 2. Résultats

II) 3) c) 3. Discussion

II) 1) Généralités sur le polytétrafluoroéthylène (PTFE)

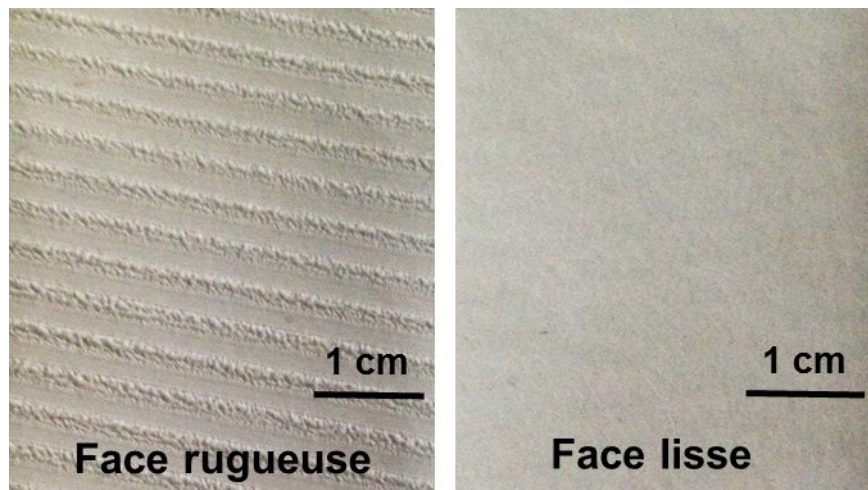
II) 1) a) Structure et propriétés générales

Le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE, Trademark Gore-Tex_ [W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ]) est un matériau synthétique utilisé communément pour de multiples indications, y compris comme un biomatériau biocompatible. C'est un polymère composé de monofilament, qui présente une grande résistance thermique et chimique, d'où sa très large utilisation comme revêtement antiadhésif dans les ustensiles de cuisine. Il s'agit d'un matériau tendre et facilement déformable.

Historiquement, le polytétrafluoroéthylène (PTFE, Teflon®) découvert en 1938 est un polymère constitué d'une agrégation de $(C_2F_4)_n$. En 1969, R.W. Gore a développé le ePTFE (expanded-PTFE) qui est issu de l'expansion du polymère de Teflon.⁴⁹⁻⁵⁰ La structure du ePTFE laisse apparaître des nœuds reliés par de fins filaments. Les espaces inter-fibrillaires déterminent la porosité du produit expansé. Sa microstructure, et notamment la taille des pores, peut être modulée en agissant sur la température ou les paramètres d'élongation lors de la mise en forme du PTFE. Ainsi, par exemple, ce sont les paramètres thermiques qui permettent d'obtenir une membrane de ePTFE présentant des faces avec des états de surface différents.⁵¹ La taille des pores de cette structure 3D complexe est d'environ 30 μm pour le Gore-tex®, par exemple ; ce qui place le matériau dans la catégorie des matériaux microporeux.⁵⁰ L'espace occupé par l'air représente 80 à 85 % du volume de la structure.⁴⁹ La structure fibrillaire confère au ePTFE une plus grande résistance à la traction : par exemple, la résistance à la rupture par traction d'une membrane de PTFE ayant une microporosité de 90% est de 69 MPa.⁵¹ Le PTFE est chimiquement inerte et chargé négativement à cause des atomes de fluor qui forment une barrière protectrice autour des atomes de carbone. C'est un polymère très hydrophobe et la prothèse en ePTFE standard garde une stabilité structurale après implantation.⁴⁹

II) 1) b) ePTFE en pratique clinique

Le ePTFE a été utilisé pour la première fois en pratique clinique en 1972 en tant que prothèse vasculaire puis a été appliqué à la réparation des défauts de la paroi abdominale.⁵⁰ Ainsi, le Gore Tex Dual Mesh® a été développé par W.L. Gore afin d'améliorer les caractéristiques d'incorporation tissulaire. Il est composé de deux surfaces bien distinctes (**Figures 2.1**) : une face péritonéale dite « lisse » qui est microstructurée (micropores $< 3 \mu\text{m}$), alors que la face pariétale (ou dans la HDC la face orientée vers le thorax) présente des dépressions peu profondes avec des pores macroscopiques (porosité comprise entre 30 et 60 μm).⁵² Cette face macroporeuse doit favoriser la formation de tissu de granulation, augmente la migration cellulaire, l'infiltration protéique et l'incorporation de collagène, alors que la face lisse permet de limiter la pénétration cellulaire.^{50, 53} Ainsi, cette face lisse permet de diminuer les phénomènes d'adhérences^{50, 53-54} par la formation d'une couche mésothéliale constituant un néopéritoéum à sa surface. Ce phénomène est déjà présent au 3^e jour après l'implantation et est complet au 7^e jour.⁵³ La prothèse devient totalement encapsulée par des tissus conjonctifs, sans pour autant présenter d'intégration tissulaire ni d'adhérence avec les anses digestives.⁵⁵ En effet, il a été décrit que des matériaux avec des pores de taille supérieure ou égale à 100 μm engendraient une meilleure incorporation tissulaire, alors que ceux avec des pores de taille inférieure à 75 μm étaient plus sujets à une encapsulation qu'à une infiltration par les tissus hôtes.⁵⁰ De plus, la formation de cette couche régulière à la surface de cette face lisse dépend surtout de sa configuration spatiale et moins de sa composition chimique : le ePTFE présenté sous forme de maille va conduire à la formation d'un mésothélium irrégulier, qui est plus susceptible de développer des adhérences.⁵⁶



Figures 2.1 : Vues macroscopiques des deux faces du Gore Tex Dual Mesh®.

II) 1) c) ePTFE utilisé en pratique clinique : analyse microscopique

Dans le traitement des HDC, la littérature concernant l'étude en microscopie de la prothèse implantée est très pauvre : il existe seulement deux études chez l'animal.

Newman *et al.* a évalué en 1985 le PTFE comme prothèse diaphragmatique dans le traitement de larges défauts chez le chien, sur une durée totale de 7 mois. L'analyse en microscopie photonique révèle une infiltration fibroblastique de la prothèse à 4 mois et une incorporation tissulaire complète à 7 mois.

En 2000, d'autres auteurs ont également conduit une analyse en microscopie photonique de l'incorporation tissulaire du PTFE dans le cadre de la HDC chez des agneaux sur une période de 6 mois. Au niveau de l'interface entre le patch implanté et les tissus hôtes, il a été mis en évidence la présence d'une importante réaction macrophagique avec un décollement du tissu biologique de la surface de la prothèse. Les auteurs n'ont pas noté de pénétration cellulaire dans les interstices du PTFE, mais mentionnent, par contre, une importante réponse fibroblastique en périphérie. L'étude

conclut à l'existence d'une importante réaction tissulaire à la prothèse et que la séparation entre l'implant et les tissus pouvait être un facteur de risque de récurrence.

La littérature est riche en travaux de microscopie photonique et électronique à balayage mentionnant les capacités d'incorporation tissulaire et de pénétration cellulaire des prothèses en ePTFE. Par contre, les données à l'échelle ultrastructurale sont beaucoup plus rares. Pourtant, l'analyse ultrastructurale des réponses biologiques à la surface d'un biomatériau s'avère essentielle à la compréhension de la cascade d'événements qui conduit à l'intégration tissulaire d'un implant.

Ainsi, certains auteurs ont réalisé des analyses en microscopie électronique en transmission (MET) de prothèses vasculaires en PTFE implantées chez des modèles animaux, mais sans jamais présenter l'intégralité des interfaces entre le PTFE et le matériel biologique.⁵⁷⁻⁵⁸ En effet, des investigations microscopiques plus récentes réalisées sur des sections de PTFE ont mis en exergue les difficultés rencontrées pour obtenir des interfaces intactes entre le biomatériau et les tissus biologiques le recouvrant avec des décollements du PTFE.⁵⁹ À notre connaissance, les rares publications de micrographies de MET de PTFE, pour des prothèses vasculaires chez le lapin ou des implants dentaires chez l'homme, n'apportent pas un schéma satisfaisant des processus biologiques se déroulant à la surface et à l'intérieur de l'implant.⁶⁰⁻⁶¹

II) 2) Principales méthodes de caractérisation

II) 2) a) Microscopie électronique à balayage (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

cadodylate 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 (**Figure 2.2**) 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 CO₂ : soit 31 °C et 74 bar, 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 2.2**). 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 2.2**). Les échantillons ainsi déshydratés sont ensuite métallisés avec un alliage Au/Pd (Humer junior, Siemens, Karlsruhe, Germany) avant d'être analysés au microscope électronique.

Les analyses MEB ont été réalisées soit avec un microscope Hitachi TM-1000 (Hitachi, Tokyo, Japan) soit avec un microscope Quanta FEG-250 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). Ce dernier microscope nous a également permis de réaliser des observations en mode environnemental (ESEM), c'est-à-dire sans déshydratation ni métallisation des spécimens. Les matériaux non biologiques et secs, comme le ePTFE, sont simplement métallisés avant d'être analysés au MEB.

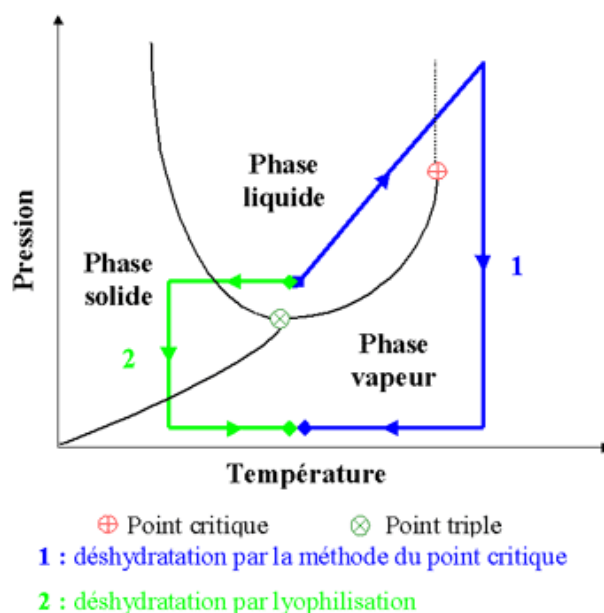


Figure 2.2 : Principe de la technique de dessiccation par contournement du point critique. 1 : déshydratation par la méthode du point critique ; 2 : déshydratation par lyophilisation.

II) 2) b) Microscopie électronique en transmission (MET)

Les échantillons biologiques sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 4% et paraformaldéhyde 1% dans un tampon cacodylate 0,1M (pH 7,4). Après 2 rinçages de 10 minutes dans le même tampon, une post-fixation est réalisée avec du tétroxyde d'osmium 1% dans un tampon cacodylate 0,1M 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 (Diméthylaminoéthanol) 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 h 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 48h.

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 ePTFE 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 min et une solution de citrate de plomb pendant 10 min (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.

II) 2) c) Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique AFM (Atomic Force Microscopy) permet l'étude de surface de matériaux à l'échelle atomique. Elle repose sur l'interaction entre une sonde de taille nanométrique et une surface. Elle permet d'imager et de caractériser les propriétés physicochimiques et mécaniques de spécimens.

Les analyses AFM sont réalisées 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® qui est une technique d'optimisation d'imagerie. Le mode ScanAsyst® 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.⁶² Les mesures sont réalisées à des vitesses d'approche et de retrait constantes. Les courbes de force enregistrées sont ensuite analysées avec le logiciel NanoScope Analysis (Bruker Corporation, Santa Barbara, CA USA). Les modules élastiques des échantillons sont déterminés en utilisant le modèle de Hertz.⁶³

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis avec le logiciel SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL. USA).

II) 2) d) Evaluation de la biocompatibilité

Deux principaux types cellulaires humains sont utilisés pour la culture cellulaire (Numéro d'autorisation du Comité d'éthique : DC-2015-2364) :

- Des fibroblastes dermiques humains primaires obtenus par la méthode des explants à partir de prépuces humains.
- Des cellules souches de la gelée de Wharton obtenues par lyse enzymatique à partir de cordons ombilicaux.

II) 2) d) 1. Culture cellulaire de 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 mm³, 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 min 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 1.10^4 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 CO₂. Le milieu est changé toutes les 48 h 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).

II) 2) d) 2. Culture cellulaire de 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/cm² dans du milieu de culture α -MEM 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 CO₂ 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).

II) 3) Caractérisation du ePTFE

II) 3) a) Caractérisation en microscopie électronique

Le Gore Tex Dual Mesh® présente une structure microporeuse avec deux surfaces texturées distinctes. Nous avons voulu caractériser cette différence d'états de surfaces sur le plan microscopique (**Figure 2.3**).

La face lisse présente une surface uniformément poreuse. Elle est constituée de fins filaments qui convergent en des nœuds plus denses. Les pores inter-fibrillaires ont une taille inférieure à 3 μm . Lors de la pose chirurgicale, cette face dite « lisse » sera orientée vers l'abdomen afin de prévenir la formation d'adhérences et éviter les occlusions intestinales.⁶⁴

La face dite « rugueuse » est composée d'une alternance de sortes de bandes de textures différentes ayant une largeur de 1,5 mm :

- Les bandes appelées lisses ont une structure homogène et poreuse. Elles comportent également des nœuds de plus grande taille reliés par des filaments plus épais que ceux de la face lisse. Les espaces internodaux ont une taille de l'ordre d'une dizaine de μm .
- Les bandes appelées rugueuses ont une structure beaucoup moins homogène et moins compacte. Ces bandes sont composées en majorité par des filaments.

Le Gore Tex Dual Mesh® fait partie des prothèses avec une architecture à porosité adaptée aux tissus qui viendront à son contact. Une surface macroporeuse orientée vers la cavité thoracique doit favoriser la croissance tissulaire, alors que la surface microporeuse orientée vers la cavité abdominale est censée prévenir la formation d'adhérences.⁶⁴

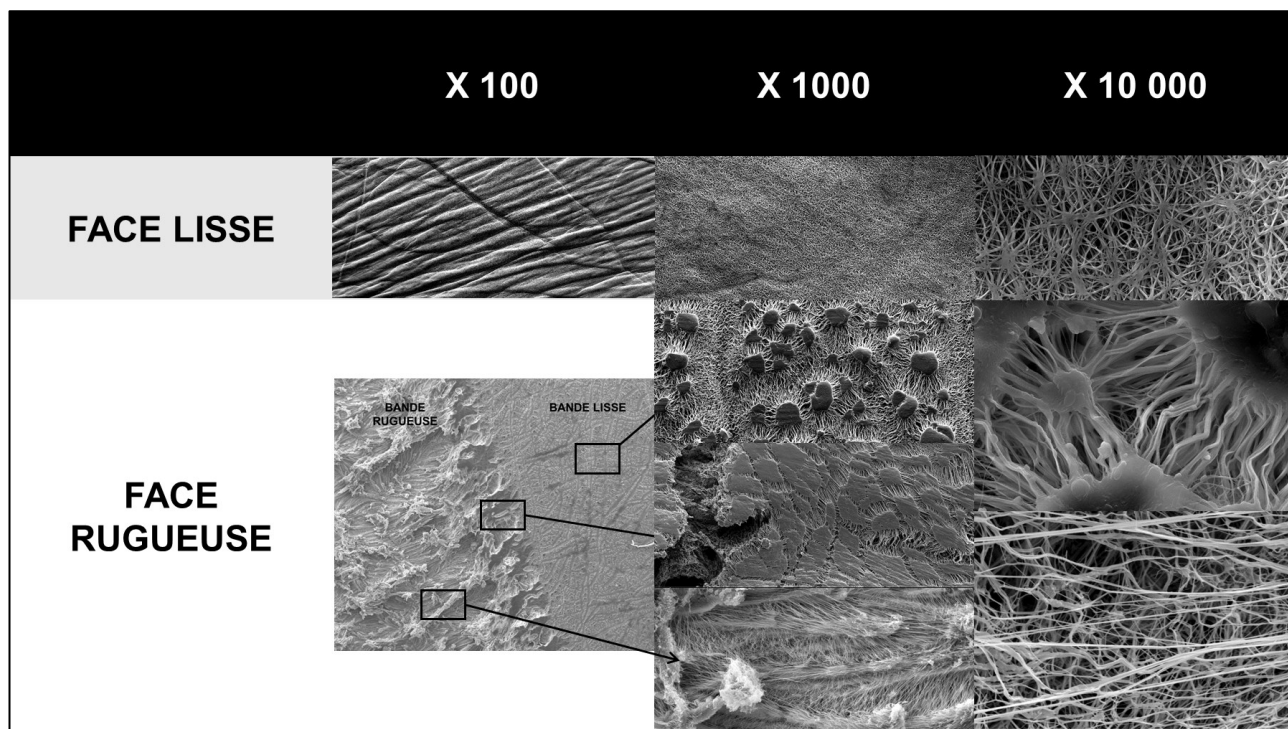


Figure 2.3 : Aspects microscopiques des deux faces du biomatériau Gore Tex Dual Mesh® (MEB).

L'analyse de la tranche du ePTFE 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 **Figure 2.4** montre une tranche de section en microscopie optique (MO) d'une prothèse prélevée après récurrence herniaire. On peut vérifier, au niveau de cette prothèse en ePTFE implantée plusieurs mois, la structure poreuse du biomatériau. On note également une réponse de l'hôte sur les deux surfaces de la prothèse (étoiles). Cependant, le revêtement biologique est plus important sur le côté rugueux, qui était orienté vers le thorax. Ce recouvrement néoformé se colore plus fortement avec le bleu de toluidine ; ce qui traduit une infiltration biologique importante dans les interstices de la face rugueuse (flèche).

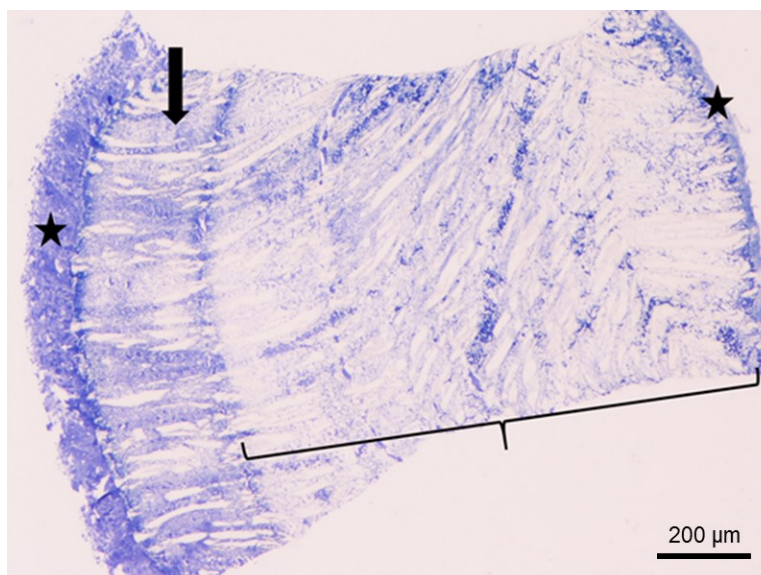


Figure 2.4 : Observation en microscopie photonique d'une tranche provenant d'un échec de prothèse de ePTFE implantée pendant plusieurs mois chez l'homme (bord gauche : face orientée vers le thorax ; bord droit : face orientée vers l'abdomen). L'intérieur du biomatériau apparaît poreux (parenthèse). Le matériel biologique déposé est fortement coloré (étoiles). La face rugueuse présente une structure macroporeuse (flèche). Bleu de toluidine, 10 x.

II) 3) b) Etude *in vitro*

La caractérisation biologique du ePTFE vierge a été réalisée en utilisant des fibroblastes humains primaires, selon le protocole décrit précédemment.

Ces cellules présentent un bon étalement cellulaire sur la surface témoin (verre) avec des protrusions cytoplasmiques à la surface du substrat et entre les cellules (**Figure 2.5**). Le comportement cellulaire est très différent sur la face lisse du ePTFE avec des cellules arrondies regroupées en amas qui se détachent spontanément de la surface (**Figure 2.6**).

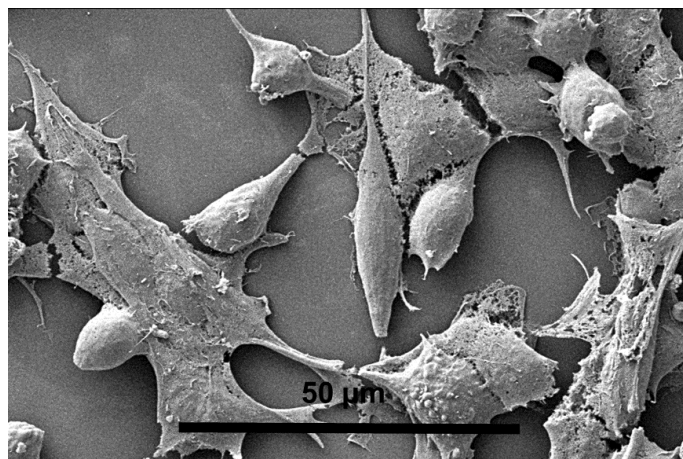


Figure 2.5 : Culture cellulaire de fibroblastes humains primaires sur du verre (témoin). MEB.

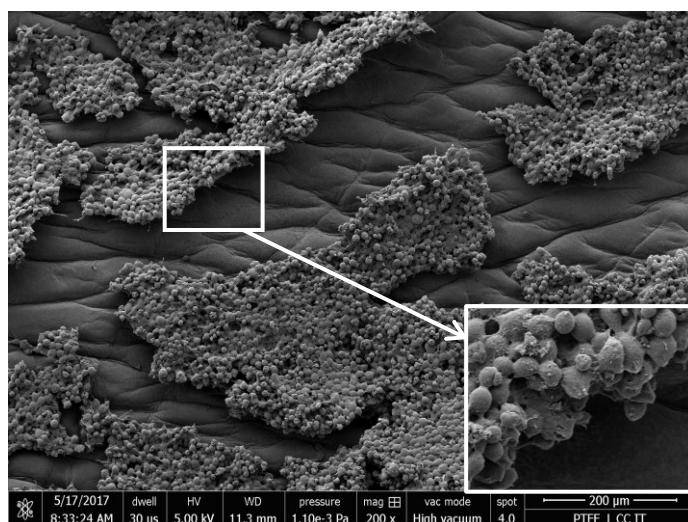


Figure 2.6 : Amas cellulaires posés à la surface de la face lisse du ePTFE. Insert : absence de protrusions cytoplasmiques. Les cellules ne semblent pas adhérer au substrat. MEB.

Sur la face rugueuse (**Figures 2.7, 2.8, 2.9**), le comportement cellulaire se rapproche de celui observé sur la surface témoin en verre (**Figure 2.5**) : sur la bande lisse de cette face rugueuse, les cellules ont un aspect confluent et forment un tapis cellulaire (**Figure 2.7**), alors que sur la bande rugueuse ce recouvrement cellulaire est moins homogène avec des cellules pénétrant les anfractuosités

du biomatériau (**Figure 2.8**). On remarque également que ces cellules ont une affinité pour les bandes rugueuses et lisses. On note souvent des ponts de matière biologique à travers les zones de transition entre ces deux bandes (**Figure 2.9**). Il semble que les cellules sondent la surface du biomatériau pour coloniser les zones propices à leur développement.

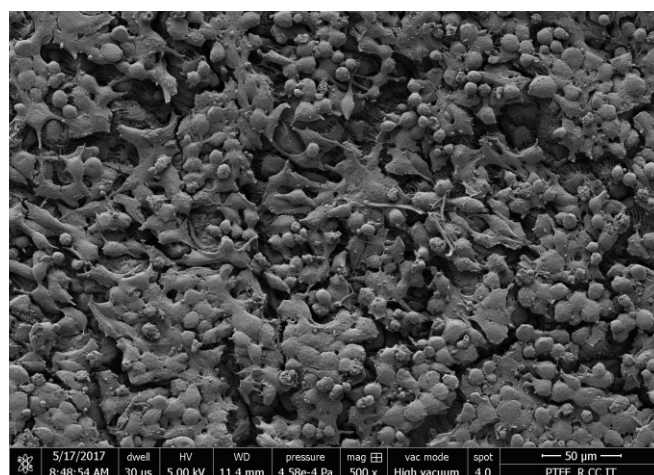


Figure 2.7 : Tapis cellulaire confluent recouvrant une bande lisse de la face rugueuse du ePTFE.

Présence de protrusions cellulaires. MEB.

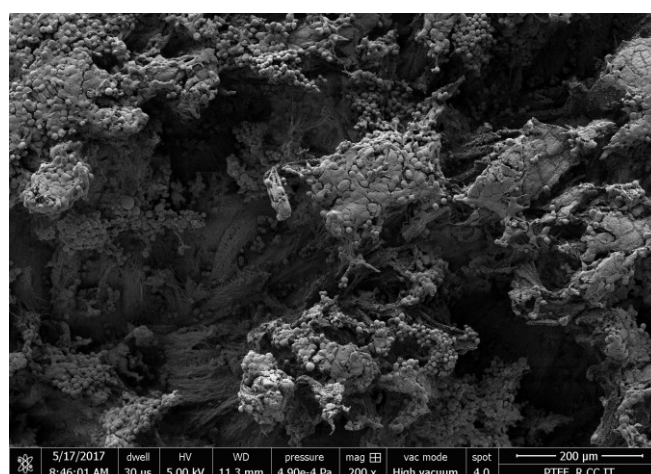


Figure 2.8 : Fibroblastes disséminés au niveau d'une bande rugueuse de la face rugueuse. MEB.

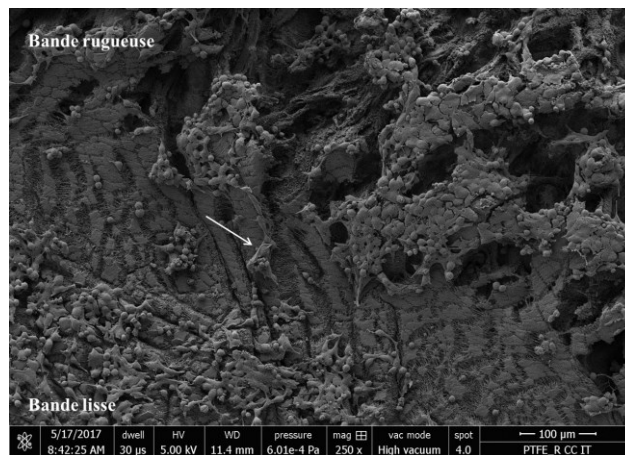


Figure 2.9 : Zone de transition entre bande lisse et bande rugueuse. Les éléments cellulaires « pontent » cette zone de transition (flèche). MEB.

Les images de MET montrent l'aspect typique de la structure poreuse du ePTFE, ainsi que les cellules fibroblastiques posées à sa surface. Ces cellules ne présentent que rarement des points de contact focaux avec la surface du biomatériau (**Figure 2.10**). Par contre, l'analyse visuelle du noyau montre une prédominance d'euchromatine (chromatine décondensée, ADN actif) qui signe une phase d'expression génique (**Figure 2.11**).

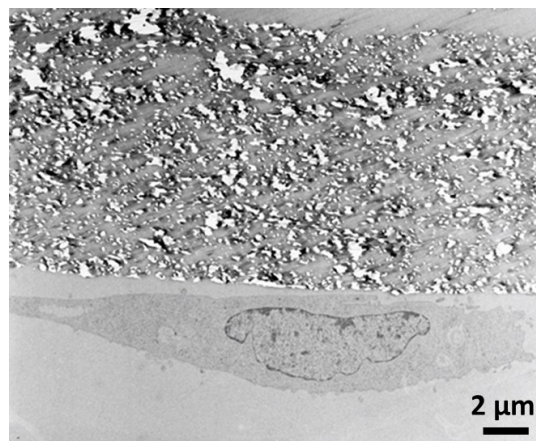


Figure 2.10 : Fibroblaste humain primaire posé à la surface du ePTFE. MET.



Figure 2.11 : Fibroblaste humain primaire posé à la surface du ePTFE : prédominance de chromatine décondensée (euchromatine) à l'intérieur du noyau. MET.

II) 3) c) Etude *in vivo*

Nous avons aussi pu étudier le comportement *in vivo* du ePTFE utilisé dans le traitement de la HDC, car nous avons eu l'opportunité de récupérer deux explants après récurrence herniaire. L'analyse ultrastructurale du premier explant a fait l'objet d'une publication récente.⁴⁸

II) 3) c) 1. Méthodologie

Le premier cas concerne un enfant présentant une HDC de type D, traité au 2^e jour de vie par laparotomie avec un remplacement diaphragmatique utilisant une prothèse en ePTFE (Gore Tex DualMesh®, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ). Les suites postopératoires immédiates ont été sans particularité. Devant des difficultés alimentaires et un retard staturo-pondéral, le diagnostic de récurrence herniaire a été posé à 10 mois. La reprise chirurgicale a consisté en une dépose de la prothèse et la pose d'un implant plus grand et mieux adapté à la taille de l'enfant en utilisant le même biomatériau.

Le second cas concerne un enfant présentant une HDC de type C, traité au 2^e jour de vie par thoracoscopie convertie en thoracotomie avec mise en place d'une prothèse en ePTFE. Il a présenté à partir du 7^e mois de vie les mêmes symptômes que ceux mentionnés précédemment évoluant de façon *crescendo* avec, également, un diagnostic de récurrence herniaire un mois plus tard. La reprise chirurgicale a consisté en la dépose de la prothèse et l'implantation d'une prothèse plus grande.

Les analyses histologiques sont menées sur trois zones : le centre de la prothèse (zone A), la périphérie de la prothèse sans lâchage (zone B) et la périphérie de l'implant avec lâchage (zone C). Les échantillons sont analysés en MEB, MET et AFM. Pour illustrer cette répartition, le plan de l'étude microscopique de l'explant n°2 est présenté en **Figure 2.12**.

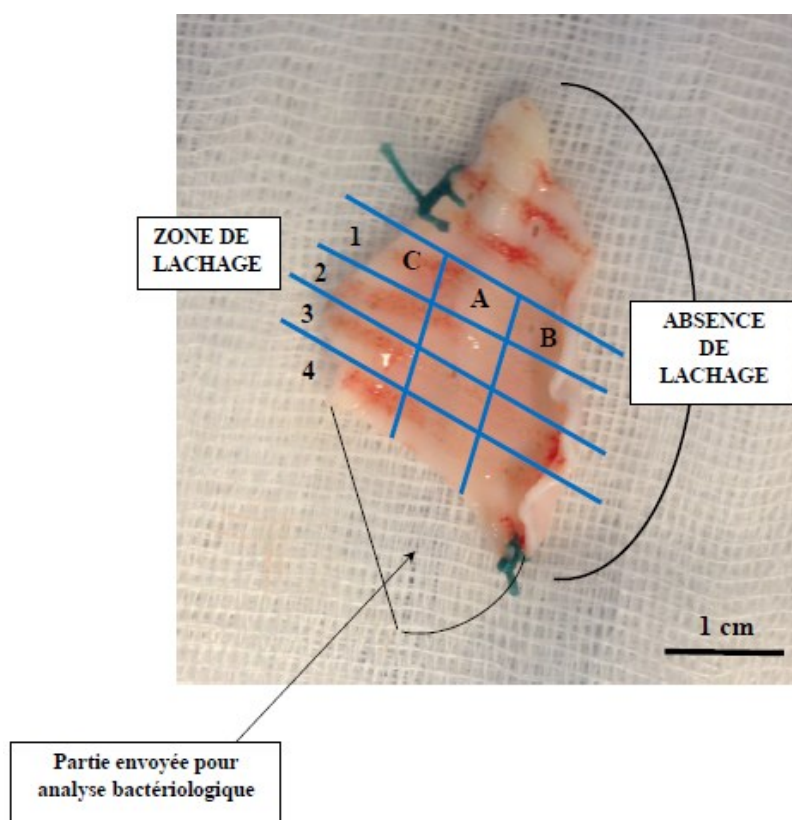


Figure 2.12 : Explant n°2, vue de la face rugueuse. A : centre de la prothèse ; B : périphérie de la prothèse sans lâchage ; C : périphérie de la prothèse avec lâchage. 1 et 2: analyses MEB ; 3: analyses MET ; 4: analyses AFM.

Les valeurs quantitatives (modules de Young) sont comparées en utilisant le test de Student ou le test de Mann-Whitney sur le logiciel SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CAL, USA).

II) 3) c) 2. Résultats

Les observations MEB nous permettent de bien appréhender la réponse tissulaire de l'hôte à la prothèse implantée. Sur la face rugueuse, nous avons observé un important dépôt de tissu conjonctif pour les trois zones du ePTFE (**Figure 2.13.1**). Par contre, ce dépôt est nettement moins important sur la face lisse de l'implant (**Figure 2.13.2**). Ainsi, nous avons focalisé notre attention sur la face rugueuse des explants, où l'importance du dépôt permet d'analyser les différences notables entre les trois zones.

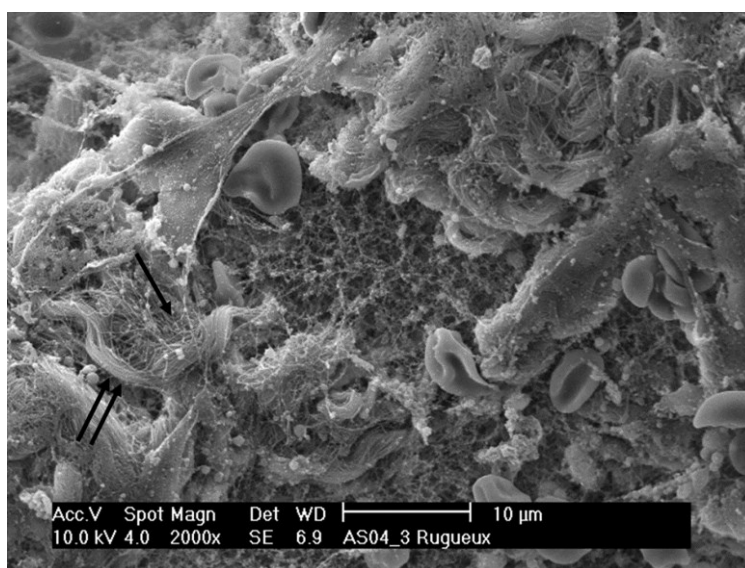


Figure 2.13.1 : Au sein du matériel biologique recouvrant la face rugueuse (explant n°1, zone A), visualisation d'un fin réseau fibrillaire (flèche) ou de faisceaux de fibres (double flèche). MEB.

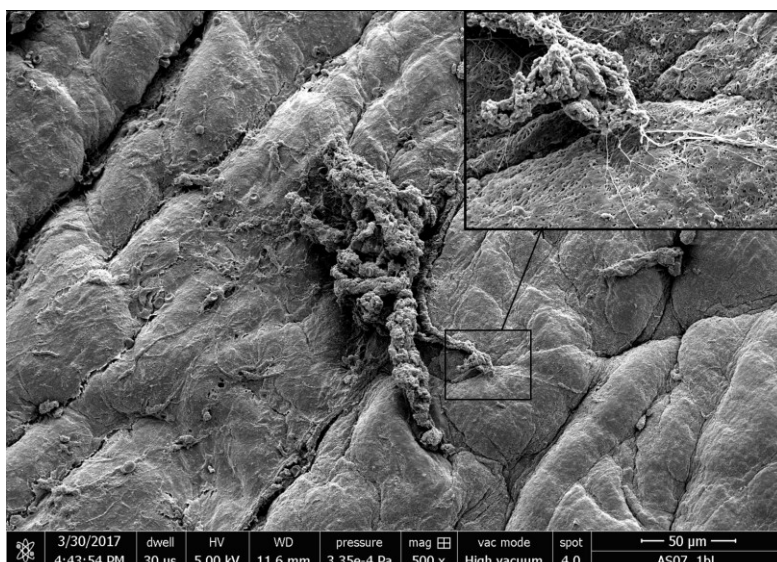


Figure 2.13.2 : Matériel biologique épars visible à la surface de la face lisse de l'explant (explant n°2, zone A). Insert : prolongements cellulaires à la surface du ePTFE. MEB.

Les observations MET réalisées sur des coupes transversales révèlent une infiltration du ePTFE par de la matrice extra-cellulaire (MEC) synthétisée par les cellules environnantes (**Figures 2.14.1, 2.14.2**). Il apparaît que cette infiltration biologique est prédominante dans la région centrale de l'explant (zone A) (**Figures 2.14.1, 2.14.2**), avec la présence de faisceaux denses de fibres de collagène (**Figures 2.14.2, 2.14.3**) ou de réseaux fibrillaires (**Figure 2.14.4**). Au niveau des régions périphériques (zone B) et en particulier de la zone avec lâchage (zone C), on note beaucoup moins de MEC (**Figures 2.15.1, 2.15.2, 2.15.3, 2.15.4**).

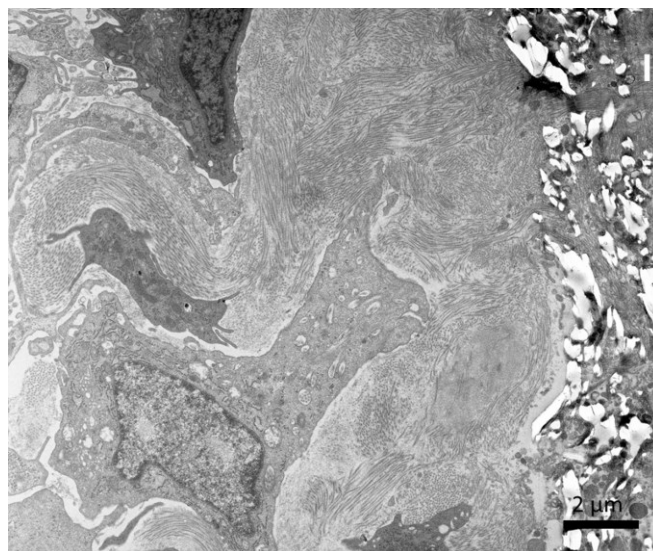


Figure 2.14.1 : Présence de cellules au sein d'une MEC bien développée à la surface de l'explant (I)
(explant n°1, zone A). MET.

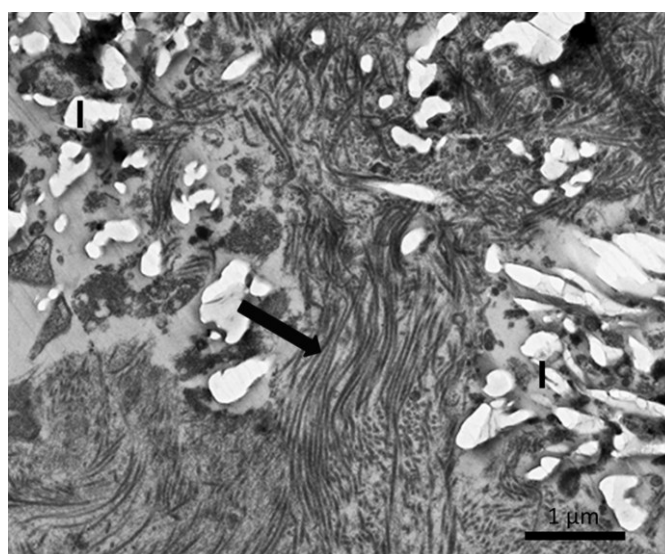


Figure 2.14.2 : Visualisation de fibres de collagène (flèche) s'enfonçant à l'intérieur de la structure
poreuse de l'implant en ePTFE (I) (explant n°1, zone A). MET.

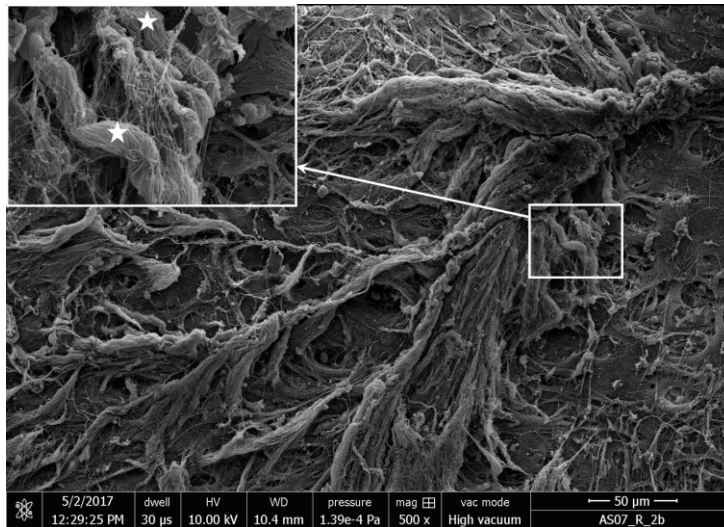


Figure 2.14.3 : Tapis de MEC recouvrant totalement la surface de l'explant avec, en plus fort grossissement (insert), visualisation d'épais faisceaux de fibres de collagène (étoiles) (explant n°2, zone A). MEB.

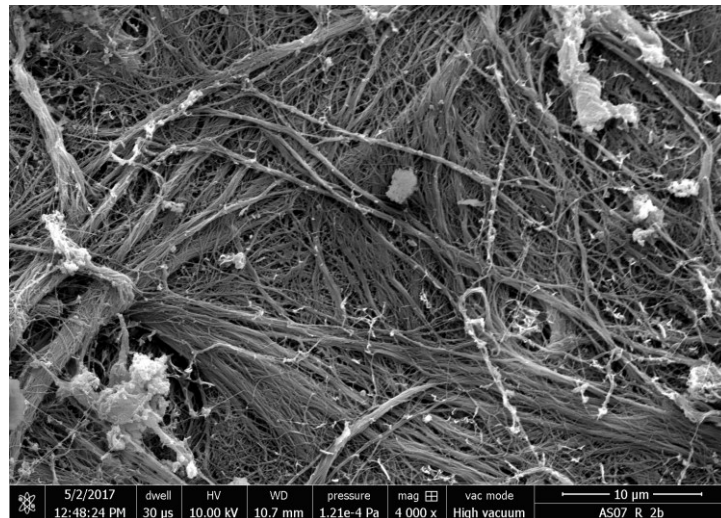


Figure 2.14.4 : Important réseau fibrillaire recouvrant toute la surface de l'explant (explant n°2, zone A). MEB.

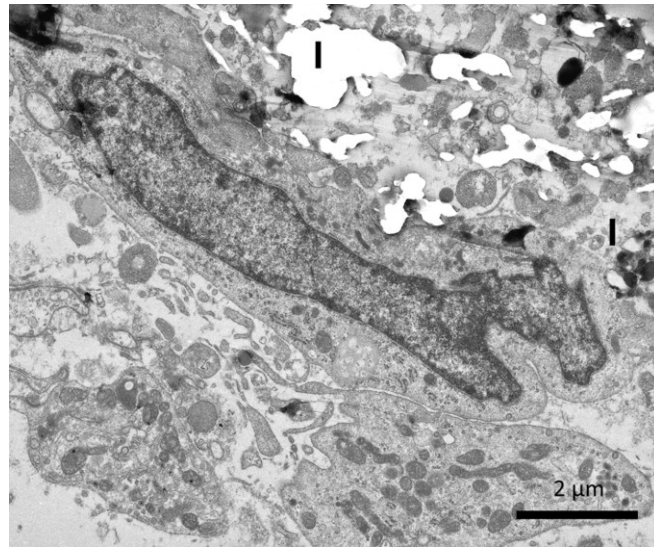


Figure 2.15.1 : Contact direct entre une cellule et la structure poreuse du ePTFE (I) (explant n°1, zone B). MET.

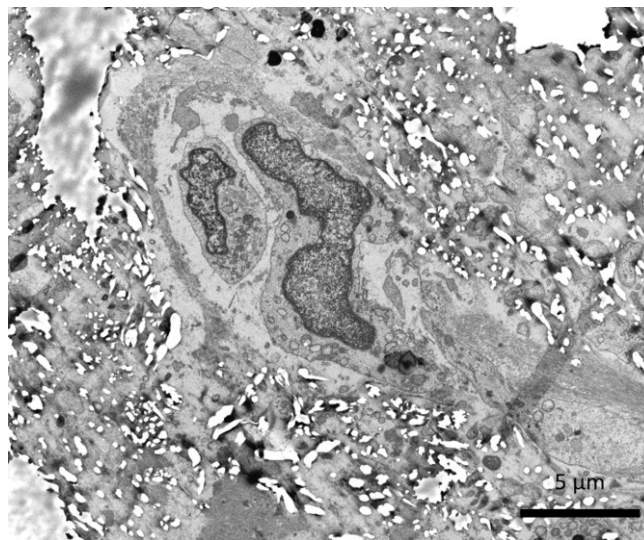


Figure 2.15.2 : Raréfaction de la MEC, malgré la présence de cellules à l'intérieur du biomatériau poreux, en comparaison avec la zone centrale A (explant n°1, zone B). MET.

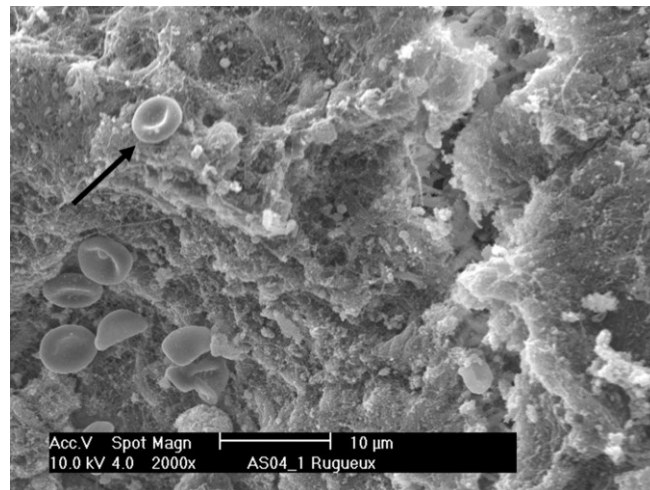


Figure 2.15.3 : Peu de fibres de collagène sont visibles au sein de la MEC recouvrant le ePTFE (explant n°1, zone B). Flèche = hématie. MEB.

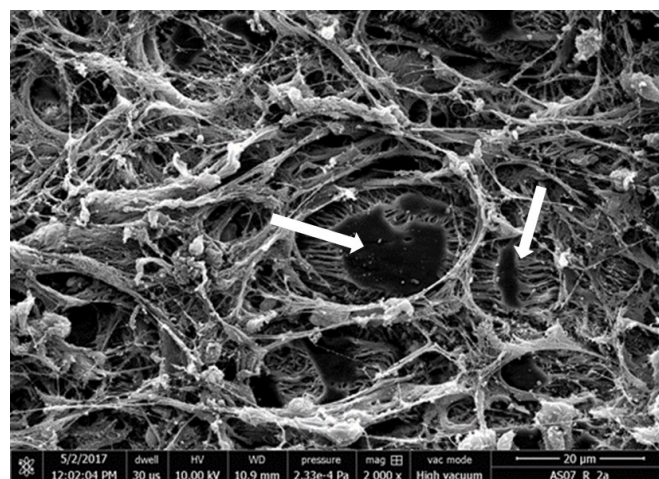


Figure 2.15.4 : On note une nette diminution de la MEC synthétisée à la surface de la face rugueuse de l'explant dans la zone avec lâchage en comparaison avec la zone centrale (explant n°2, zone C). On remarque aussi que la réponse biologique « évite » les surfaces plus lisses (flèches) des « nœuds » du ePTFE. MEB.

À l'échelle ultrastructurale, nous avons observé un contact étroit entre le ePTFE et le tissu biologique nouvellement synthétisé à la surface de l'explant, avec de la MEC (**Figure 2.14.1**) et des fibres de collagène pénétrant dans le biomatériau poreux (**Figure 2.14.2**). Ce contact étroit est évident

à la surface du biomatériau (**Figures 2.15.1, 2.16**), ainsi qu'à l'intérieur de la structure poreuse (**Figure 2.15.2**). Les coupes transverses en MET ont clairement montré la pénétration d'éléments cellulaires dans la profondeur de la structure poreuse du ePTFE, en particulier en zone centrale A (**Figure 2.17**). En comparaison, dans la zone de lâchage où la prothèse s'est détachée (zone C), les observations au MEB ont mis en évidence de rares cellules dispersées au sein d'une fine couche de tissu conjonctif. De plus, dans cette zone de lâchage, nous avons pu observer, sur les deux explants, une tendance à une orientation parallèle des faisceaux de fibres de collagène (**Figure 2.18**).

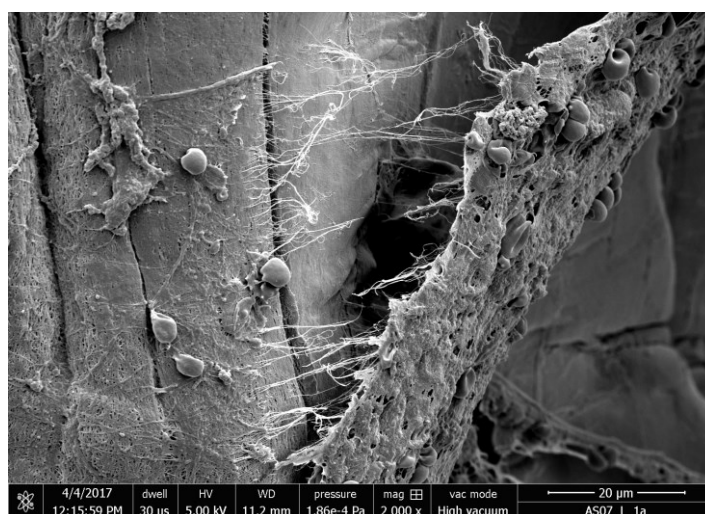


Figure 2.16 : À proximité d'un point de suture, on observe un décollement du tapis conjonctif nouvellement synthétisé et faiblement fixé à la surface de la face lisse du ePTFE (explant n°2, zone C). MEB.

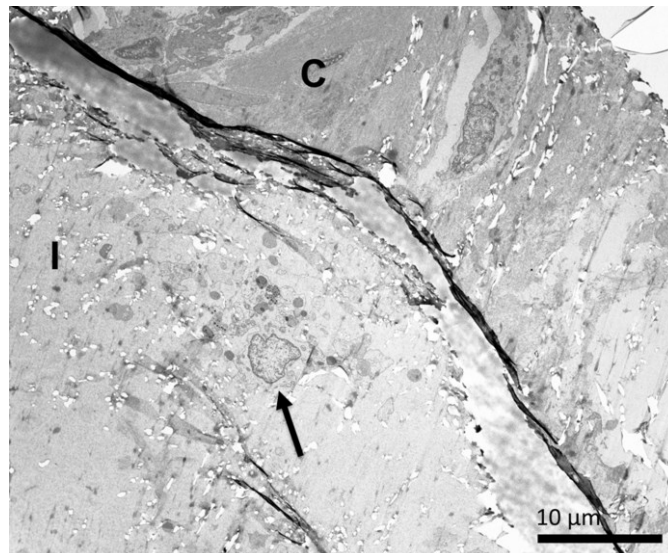


Figure 2.17 : Vue sagittale en profondeur de la prothèse avec le tissu conjonctif nouvellement synthétisé à sa surface. Des cellules sont observées à l'intérieur de la structure poreuse du ePTFE (flèche). I = implant, C = matériel cellulaire. (explant n°1, zone A). MET.

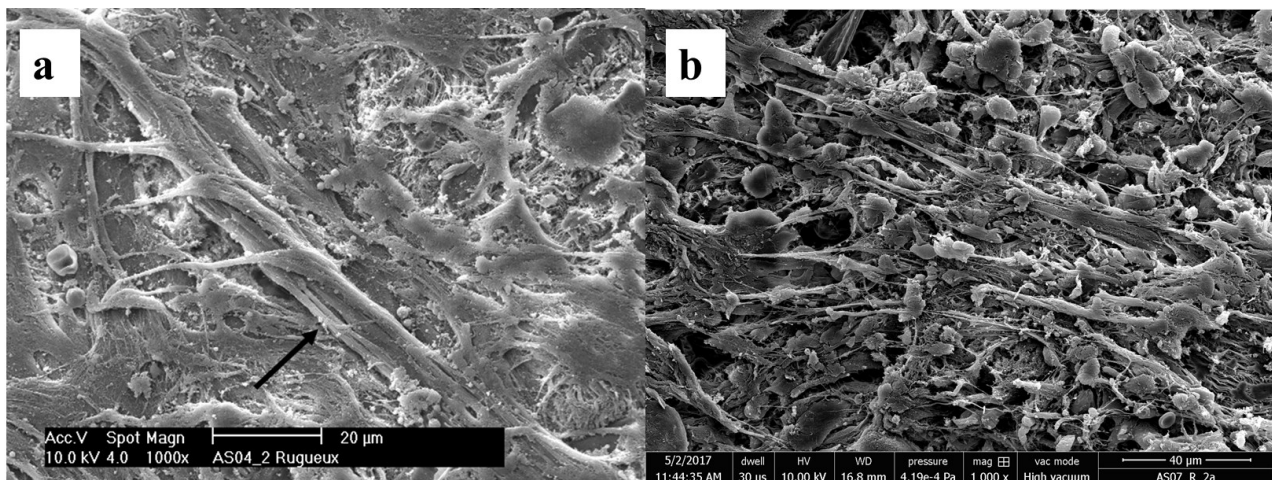


Figure 2.18 : Des modifications structurales du tissu conjonctif néoformé sont apparentes dans la zone périphérique C. Des faisceaux de fibres de collagène (flèche) sont orientés parallèlement aux forces de traction exercées par les points de fixation de la prothèse (a : explant n°1 ; b : explant n°2 ; zone C).

MEB.

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 ePTFE 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 II**). De plus, 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 ePTFE vierge. Néanmoins il apparaît qu'avec le temps, après déposition des 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 ce que les cellules rencontrent initialement sur le ePTFE 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) ($p=0,002$).

	ePTFE	Zone A	Zone B	Zone C
Module de Young (kPa)	$295,0 \pm 43,6$	$22,9 \pm 1,9$	$27,7 \pm 6,6$	$172,3 \pm 11,2$

Tableau II : Mesures des modules de Young du ePTFE et des 3 zones de l'explant n°1 (A : centre ; B : pas de lâchage ; C : lâchage).

II) 3) c) 3. Discussion

Avant tout, il faut souligner que pour les travaux en MET, la réalisation des coupes ultrafines du biomatériau poreux ePTFE colonisé par du matériel biologique à sa surface par ultramicrotomie a été un véritable défi technologique. En effet, ce matériau est très mou en comparaison à la résine généralement utilisée pour les inclusions d'échantillons ; ce qui entraîne des difficultés au moment des coupes ultrafines avec des phénomènes de séparation au niveau de l'interface biomatériau/matériel biologique. Nous avons ainsi pu montrer pour la première fois en MET et, à partir d'un explant humain, comment le tissu conjonctif pénètre dans la profondeur de la prothèse (**Figure 2.17**). Ces observations sont d'importance, car il a été avancé qu'une telle colonisation du biomatériau devrait permettre de réduire le risque de déplacement, voire d'infection de la prothèse.⁶⁵

En 2000, Kimber *et al.* ont présenté leurs résultats de MO avec une prothèse ePTFE implantée chez le mouton. Ils ont montré qu'il existait une importante réaction inflammatoire macrophagique à l'interface prothèse/tissu biologique ainsi qu'une absence d'infiltration cellulaire dans le ePTFE ; il existait cependant un détachement, lors des coupes, des structures biologiques déposées.⁶⁶ Toujours est-il que les auteurs en ont conclu que cette séparation du tissu environnemental de la prothèse pouvait être à l'origine de récives 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 ePTFE et la réponse biologique de l'hôte (**Figures 2.14.1, 2.15.1, 2.14.2, 2.15.2, 2.17**).

En étudiant plus particulièrement la zone C correspondant à la périphérie où la prothèse s'est détachée, nous avons observé très peu d'éléments cellulaires et une MEC éparse à la surface du biomatériau. De plus, il existe globalement une organisation spécifique des fibres de collagène suivant un axe unidirectionnel (**Figures 2.18**), en comparaison avec la zone centrale A, où les fibres de collagène sont orientées de manière aléatoire (**Figure 2.14.4**). Cette orientation spécifique peut être la

conséquence de forces de traction exercées sur cette zone C. Les **Figures 2.18** illustrent les effets sur la MEC nouvellement formée des forces appliquées à la prothèse.

Malgré la résistance mécanique du ePTFE, les forces appliquées à la prothèse peuvent conduire à une récurrence herniaire. Ceci peut survenir malgré la colonisation et la pénétration de l'implant par du tissu conjonctif, comme nous l'avons démontré. Nous n'avons cependant 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.

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 ePTFE 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.⁶⁷ Ces investigations menées sur des explants nous ont ainsi fourni des informations histologiques et biomécaniques originales et nous donnent une vision plus complète de la réponse biologique au biomatériau implanté.

Le matériel extracellulaire formé en réaction aux implants joue probablement un rôle majeur dans le contrôle des réponses cellulaires. Or, peu d'informations sont disponibles sur les propriétés mécaniques de ces matrices hétérogènes et tridimensionnelles. 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 ePTFE 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 (**Figure 2.16**), 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. Les résultats obtenus concernant les propriétés mécaniques nous donnent des informations qui peuvent potentiellement expliquer certains aspects des réponses tissulaires aux biomatériaux implantés. En effet, Engler *et al.* ont démontré que la rigidité de la MEC influence le devenir de cellules souches mésenchymateuses humaines.⁶⁷ D'autres études ont également établi l'importance de la composition de cette matrice, ainsi que de sa configuration tridimensionnelle.⁶⁸⁻⁶⁹ On sait que l'adhésion cellulaire est un processus complexe au cours duquel les cellules sondent les propriétés mécaniques de leur support.⁷⁰ L'étude ultrastructurale, par microscopie électronique, des matrices élaborées à la surface d'un biomatériau s'avère donc essentielle à la compréhension de la cascade d'événements biologiques qui accompagne l'intégration tissulaire d'un implant. Les caractérisations mécaniques des MEC synthétisées sont donc des données informationnelles pertinentes qui, de plus, s'intègrent dans la continuité du travail au sein du laboratoire de recherche.

Conclusion du chapitre 2

Le ePTFE est actuellement le biomatériau le plus utilisé pour le remplacement diaphragmatique dans la HDC. Ce deuxième chapitre a permis de produire des données biologiques et mécaniques utiles pour cette application clinique spécifique. Il ressort notamment que les propriétés mécaniques du biomatériau sont satisfaisantes (une grande résistance et une certaine étirabilité), et qu'il possède des capacités d'intégration tissulaire modérées, dépendantes de la texture de sa surface.

Des investigations par MEB et MET d'explants de prothèses diaphragmatiques en ePTFE avaient déjà montré que la réponse tissulaire dépendait directement de l'état de surface du biomatériau poreux. La face rugueuse du matériau implantaire (Goretex® Dualmesh) favorise les développements cellulaires et une forte imprégnation par du tissu conjonctif. D'un autre côté, les mesures, par AFM, des modules d'Young ont révélé l'influence des contraintes mécaniques appliquées sur les propriétés mécaniques des MEC nouvellement synthétisées.

Cependant, Brouwer *et al.* expliquent les taux de récurrence herniaire par l'incapacité du ePTFE de croître avec l'enfant et par une infiltration cellulaire limitée dans la prothèse, ce que nous avons également pu mettre en évidence dans nos travaux.²⁰ Pour Mayer *et al.*, le ePTFE entrave l'incorporation correcte de l'implant dans les tissus adjacents avec une maturation collagénique limitée. En outre, d'après les mêmes auteurs, la souplesse de la membrane de ePTFE n'est pas satisfaisante, comparée aux tissus biologiques environnant la prothèse. L'étirabilité, dans le contexte de la HDC, est limitée malgré une résistance à la traction adaptée.⁷¹

Dans le prochain chapitre, nous allons présenter les différentes voies que nous avons explorées pour améliorer l'intégration tissulaire de la prothèse.

Chapitre 3 : Méthodes de fonctionnalisation du PTFE

Méthodes de fonctionnalisation du PTFE

III) 1) Fonctionnalisations avec la polydopamine

III) 1) a) Propriétés générales de la polydopamine

III) 1) b) Utilisation de la polydopamine en solution

III) 1) b) 1. Dépôt de polydopamine à l'interface solide/liquide

III) 1) b) 2. Moyen de contrôle du dépôt de polydopamine

III) 1) c) Formation d'un film de polydopamine à l'interface air/eau

III) 1) c) 1. Réalisation d'un film de PDA A/E et technique de transfert par la méthode de Langmuir-Schaeffer

III) 1) c) 2. Caractérisation du film de PDA A/E

III) 2) Évaluation biologique du PTFE fonctionnalisé avec la polydopamine

III) 2) a) Analyses *in vitro* en microscopie électronique : protocoles expérimentaux

III) 2) b) Résultats

III) 2) c) Discussion

III) 1) Fonctionnalisations avec la polydopamine

L'objectif principal de la fonctionnalisation avec la polydopamine (PDA) est de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface du ePTFE pour pouvoir agir sur la réponse cellulaire.

III) 1) a) Propriétés générales de la polydopamine

La polydopamine (PDA) est utilisée pour réaliser des revêtements qui s'inspirent des propriétés du byssus sécrété par la moule : les protéines de cette sorte de colle (mfp : mussel foot proteins) lui permettent de s'accrocher sur n'importe quel substrat en milieu sec ou aqueux. Les protéines de type mfp-3 et mfp-5 sont riches en un acide aminé particulier la L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) contenant des groupements catechol et de la L-Lysine. Les propriétés chimiques de la dopamine sont liées aux groupements catéchol et amine et en font donc un modèle simplifié de la L-DOPA et de la L-lysine vicinaux. Dans une solution à pH 8,5, la dopamine s'oxyde spontanément pour donner une substance insoluble de couleur brun-noire. 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...). L'épaisseur de ce revêtement dépend du pH. 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.⁷²⁻⁷³

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.⁷⁴ Il n'y a donc pas une PDA, mais des PDA dont la structure et les propriétés dépendent fortement des conditions réactionnelles utilisées.

Au cours de la synthèse en solution, un film de PDA se forme également à l'interface air/eau. Ce film n'est apparent qu'en l'absence d'agitation. En présence d'agitation, les forces de cisaillement interfacial vont induire la rupture de ce film. Lorsqu'il est formé, le film de PDA à l'interface air/eau va pouvoir être transféré sur la surface d'un substrat par la technique de Langmuir-Schaeffer. Dans ce mode de transfert, un substrat est placé parallèlement à l'interface air/eau et traverse cette interface à une vitesse très lente afin de permettre aux molécules présentes à l'interface air/eau de s'y déposer.⁷⁵

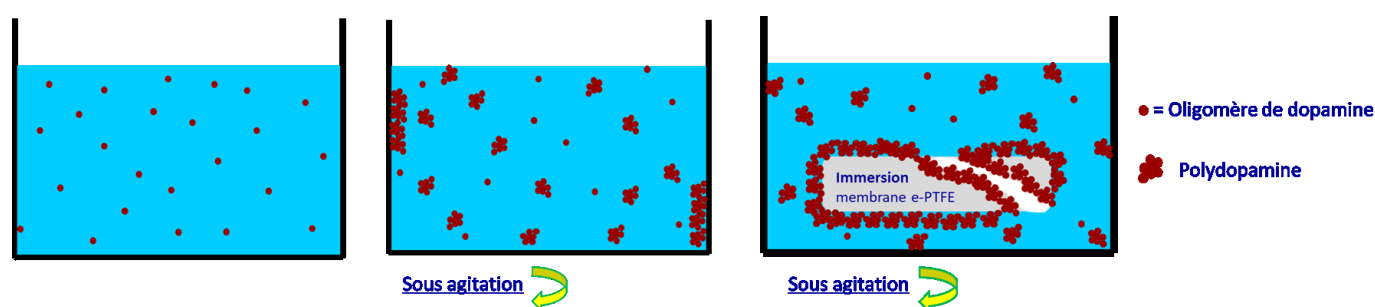
La PDA est biocompatible car sa structure est proche de la mélanine⁷⁶ qui est un pigment biologique très présent chez l'homme dans les cheveux, la peau et les yeux, sous la forme d'eumélanine et de phéomélanine.⁷³ La PDA apparaît donc être un candidat intéressant pour la fonctionnalisation de biomatériaux inertes, comme le PTFE.

III) 1) b) Utilisation de la polydopamine en solution

III) 1) b) 1. Dépôt de polydopamine à l'interface solide/liquide

Le chlorhydrate de dopamine (Sigma-Aldrich) à une concentration de 2 mg/mL (10,6 mM) est dissout dans un tampon TRIS 50 mM (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (Euromedex,

Souffelweyersheim, France) (**Figures 3.1**). Cette réaction se fait sous un flux continu d'oxygène apporté par une agitation mécanique, 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 à fortiori sur un substrat immergé dans la solution. 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. C'est ainsi qu'à l'interface solide/liquide nous pouvons observer différentes structures : des films que nous appellerons par la suite PDA S/L, des grains, ou des capsules de PDA.⁷² Ces différences seront considérées plus en détail ultérieurement grâce à des expériences de microscopie électronique.



Figures 3.1 : Formation d'agrégats et de films de PDA (PDA S/L) à la surface du ePTFE immergé dans une solution de dopamine (pH 8,5) sous agitation mécanique continue.

III) 1) b) 2. Moyen de contrôle du dépôt de polydopamine

Différents paramètres permettent de faire varier l'épaisseur et la composition chimique du dépôt de PDA :^{73, 77}

- (i) Une augmentation de la durée de la réaction entraîne une augmentation de l'épaisseur du dépôt de PDA S/L, mais une valeur plateau stationnaire va être atteinte. Cette

valeur maximale de l'épaisseur du film de PDA dépend du pH de la solution, de la concentration en dopamine et de la température à laquelle l'expérience est effectuée.

- (ii) Il est possible de changer l'oxydant (NaIO_4 par exemple) pourvu que son potentiel rédox standard soit suffisant pour oxyder la dopamine. Dans ce cas, une augmentation de la concentration de NaIO_4 permet également d'augmenter l'épaisseur du dépôt de PDA S/L. La vitesse de formation des films de PDA obtenus en présence de NaIO_4 est beaucoup plus élevée que la vitesse de formation des films obtenus en présence de O_2 . Typiquement un film de 100 nm d'épaisseur est obtenu au bout de 5 h de réaction en présence de NaIO_4 à 20 mM et à pH 5,0 tandis que 40-45 nm d'épaisseur sont atteints au bout de 16 h en présence d'oxygène dissous à pH 8,5.⁷⁷

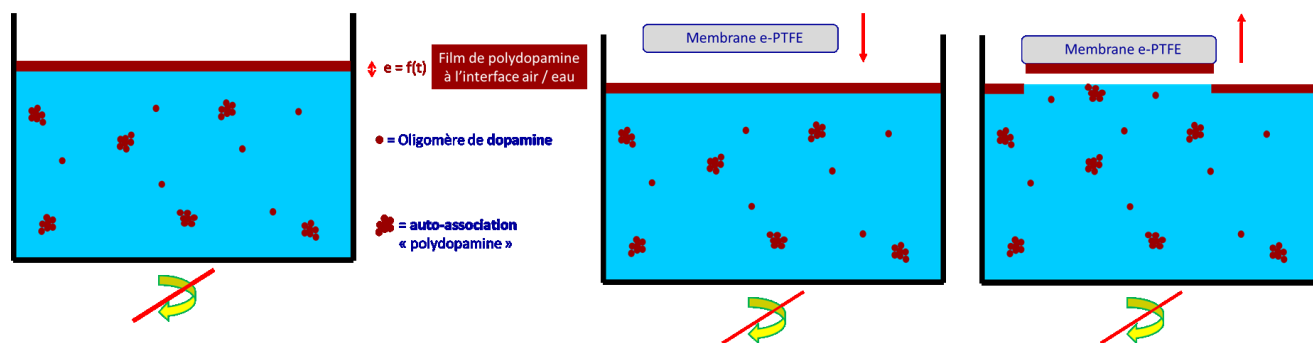
L'oxydation de la dopamine en solution aqueuse par l'oxygène de l'air en milieu basique conduit au dépôt d'un film homogène à la surface du récipient qui contient cette solution et à la surface de tout type de substrat immergé dans cette solution. L'oxydation de la dopamine conduit hélas aussi à la formation d'un précipité en solution, à la fin de la réaction. Afin de contrôler l'oxydation de la dopamine, de l'acide borique (B(OH)_3) est introduit dans le milieu réactionnel après différents temps d'oxydation de la dopamine. L'acide borique présente une forte affinité pour les fonctions catéchols et empêche leur oxydation. Nous avons démontré que l'acide borique permet d'arrêter la croissance des grains de dopamine en solution et d'obtenir une suspension colloïdale stable dans le temps, pourvu que le rapport acide borique/dopamine soit supérieur à 3. De façon simultanée, l'épaisseur du film de PDA, résultat de l'oxydation de la dopamine, reste constante dans le temps après ajout de l'acide borique en solution. L'acide borique se fixe sur le film de PDA et en modifie les propriétés de surface, notamment l'énergie d'adhésion entre le film et une pointe de Si_3N_4 (article soumis dans « ACS Applied Materials & Interfaces »).

III) 1) c) Formation d'un film de polydopamine à l'interface air/eau

III) 1) c) 1. Réalisation d'un film de PDA A/E et technique de transfert par la méthode de Langmuir-Schaeffer

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 (A/E) et il se formera un film de PDA à la surface du liquide (**Figures 3.2**). Ce film de PDA sera nommé par la suite PDA A/E. Du fait de l'évaporation de l'eau au cours de la réaction et aussi à cause de la fixation de ce film PDA A/E 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. Ce film de PDA A/E sera caractérisé dans le chapitre suivant.

Le film de PDA A/E est ensuite transféré à la surface du substrat à fonctionnaliser en utilisant la technique de Langmuir-Schaeffer.⁷⁵ Dans notre étude, elle consiste à approcher le substrat de l'interface A/E 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 A/E est d'une minute. Le PDA A/E va ainsi se détacher du film à l'interface 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 (**Figures 3.2**).



Figures 3.2 : Formation d'un film de PDA à l'interface air/eau et son transfert à la surface d'un substrat (ePTFE par exemple) par la technique de Langmuir-Schaeffer.

III) 1) c) 2. Caractérisation du film de PDA A/E

L'analyse de la formation du film PDA A/E, ainsi que l'analyse des propriétés physico-chimiques du PTFE fonctionnalisé par ce film ont fait l'objet d'une publication dans « The Journal of Physical Chemistry Letters »⁷⁸, ainsi que d'un article soumis dans « Acta Biomaterialia ».

Analyse de la formation du film PDA A/E

Le mécanisme de formation du film est étudié en utilisant la technique du tensiomètre à goutte : on mesure la tension superficielle (γ) de l'interface air/liquide en analysant la déformation d'une goutte en fonction du temps. On observe ainsi pour la formation de notre film PDA A/E (**Figure 3.3**) une première phase de latence où il y aura formation de grains de PDA à l'interface. Initialement ces grains ne sont pas en contact, puis ils vont s'agglutiner progressivement ; ce qui se traduit par une diminution de la tension de surface. Les îlots formés vont coalescer et, en fin de réaction, on atteint un plateau qui correspond à la formation complète du film. Nous avons donc démontré qu'il s'agit de phénomènes de nucléation hétérogène consistant à la formation d'îlots qui croissent et finissent par coalescer jusqu'à former un film continu.

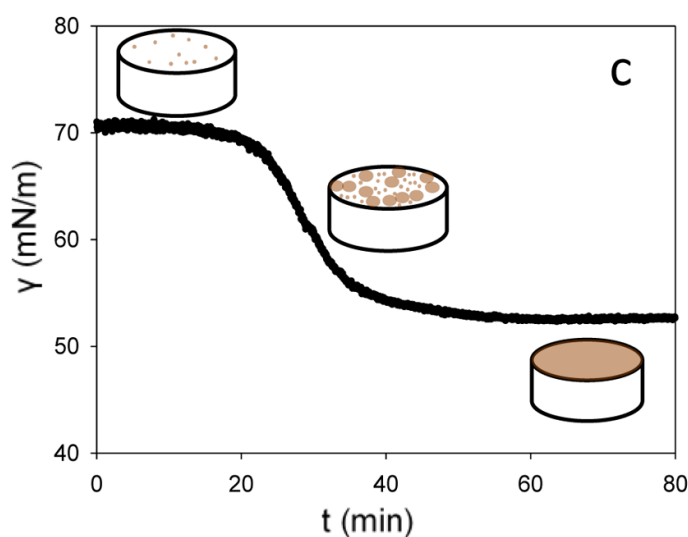


Figure 3.3 : Mesure de la tension interfaciale (γ) en fonction du temps de réaction au cours de la formation du film PDA A/E (tensiomètre à goutte).⁷⁸ La dopamine est dissoute à 10,6 mM dans du tampon Tris 50 mM à pH = 8,5.

On parle de film continu, mais avec le temps vont se former des fissures dans ce film (**Figure 3.4**). Ceci est lié aux phénomènes d'évaporation de l'eau au cours de la réaction et aussi à cause de l'accrochage de ce film de PDA A/E avec les parois du bécher. Par conséquent, les contraintes exercées fragilisent le film, surtout lorsque les temps de réaction augmentent. La multiplication du nombre de manipulation peut également induire des fissures.

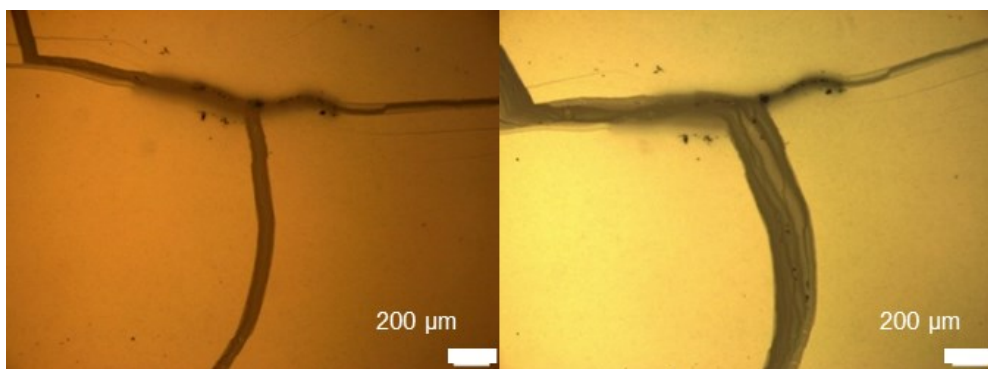


Figure 3.4 : Evolution dans le temps de fissures à la surface du film de PDA A/E (4h30 et 6h30 de réaction). Microscopie à réflexion.⁷⁸

L'analyse en ellipsométrie de la croissance du film a montré que le film de PDA croissait deux fois plus vite à l'interface A/E (PDA A/E) qu'à l'interface S/L (PDA S/L).⁷⁸

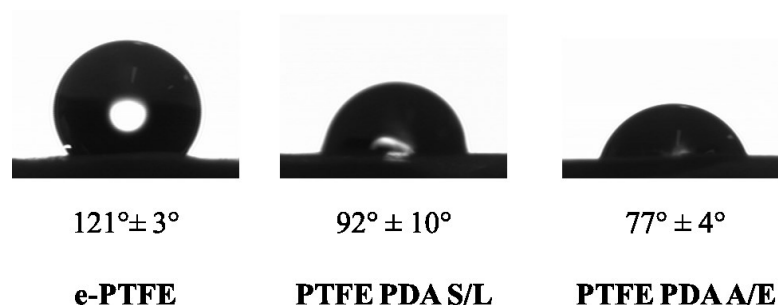
Etude des propriétés physico-chimiques du film

Le film de PDA A/E a été comparé au film de PDA S/L en spectroscopie (spectroscopie ultraviolet visible, spectrométrie photoélectronique X). Les deux types de films possèdent le même spectre et la même composition chimique et on peut donc en déduire qu'ils ont les mêmes propriétés chimiques.⁷⁸

Les résultats suivants concernent le film de PDA A/E (PTFE PDA A/E) et le film de PDA S/L (PTFE PDA S/L) utilisés pour la fonctionnalisation du biomatériau hydrophobe ePTFE.

Comme décrit précédemment, cette fonctionnalisation permet de rendre la surface du matériau plus hydrophile.⁷² Nous avons ainsi comparé les mesures d'angle de contact du ePTFE vierge, du PTFE PDA A/E et du PTFE PDA S/L. Il s'est avéré que le revêtement PTFE PDA A/E est tout aussi efficace que le dépôt en solution (PTFE PDA S/L) en termes d'hydrophilie, puisque l'on obtient une

augmentation de l'hydrophilie du ePTFE dans les deux cas et même une augmentation accentuée pour le PTFE PDA A/E (**Figures 3.5**).



Figures 3.5 : Angles de contact statiques mesurés pour le ePTFE vierge, le PTFE PDA S/L et le PTFE PDA A/E. Le liquide déposé consiste en 3 μ L d'eau distillée ultrapure.

En MEB, nous avons observé des caractéristiques de surface bien différentes entre le ePTFE vierge (**Figure 3.6.1**), le PTFE PDA S/L (**Figure 3.6.2**) et le PTFE PDA A/E (**Figure 3.6.3**). Le biomatériau vierge montre la structure fibrillaire caractéristique du produit que nous avons déjà décrite précédemment (**Figure 3.6.1**). Le PTFE PDA S/L garde cette structure fibrillaire avec cependant un épaissement des fibrilles qui sont enrobées par la PDA. Au contraire, le PTFE PDA A/E possède une surface plutôt plane qui correspond au film de PDA transféré, émaillé de fissures qui laissent entrevoir les fibrilles du ePTFE sous-jacent (**Figure 3.6.3**). À des plus forts grossissements, il apparaît que le film de PDA A/E est de nature granulaire, ce qui confirme les phénomènes de nucléation hétérogène mentionnés précédemment (**Figure 3.6.4**). À la surface des échantillons fonctionnalisés, nous notons également la présence d'agrégats de PDA (**Figures 3.6.2, 3.6.3**).

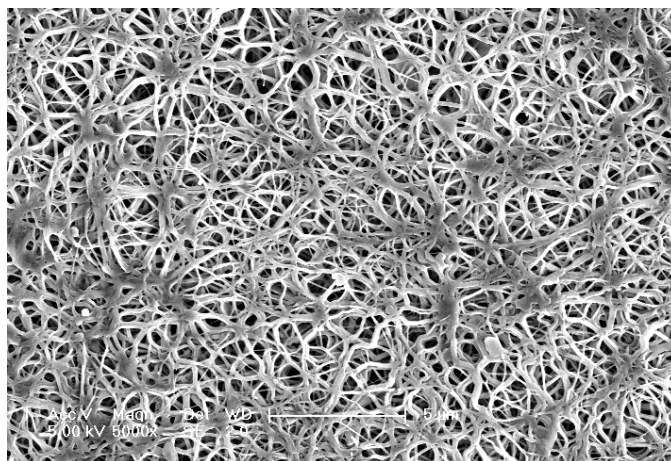


Figure 3.6.1 : Surface poreuse du ePTFE microstructuré vierge en MEB, montrant la structure fibrillaire parsemée de nœuds.

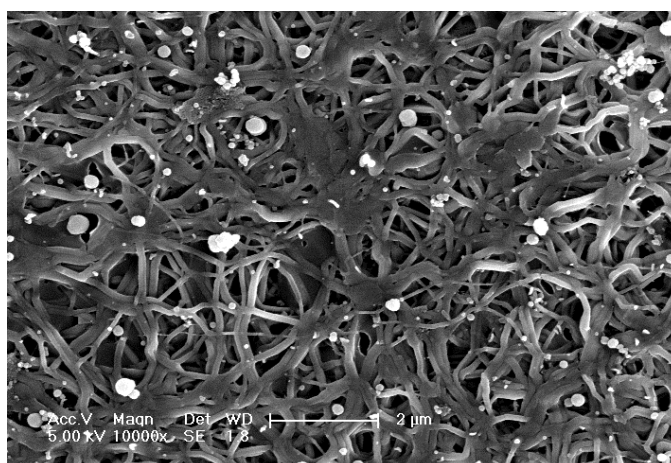


Figure 3.6.2 : PTFE PDA S/L en MEB. La PDA enrobe les fibres de PTFE. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

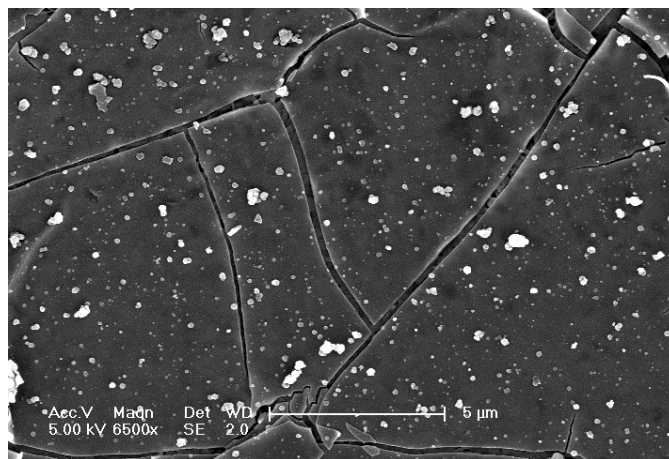


Figure 3.6.3 : PTFE PDA A/E en MEB. Les fissures dans le film de PDA transféré laissent entrevoir la structure poreuse du ePTFE sous-jacent. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

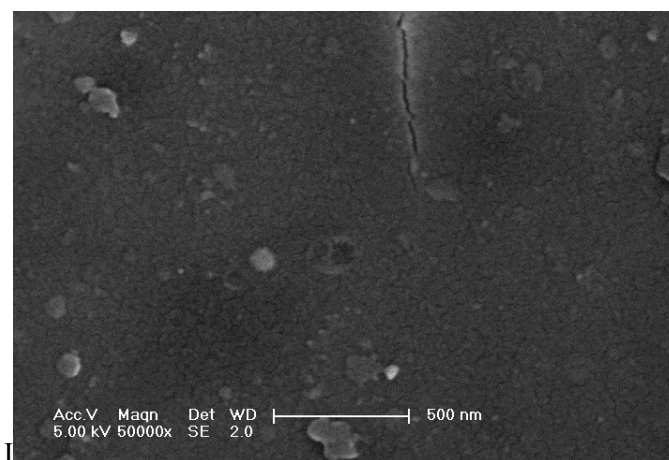


Figure 3.6.4 : À plus fort grossissement, en MEB, on vérifie l'aspect granulaire du film de PDA déposé sur le PTFE PDA A/E.

Les échantillons fonctionnalisés ont également été analysés en microscopie à force atomique (AFM) en mode « PeakForce Tapping » qui est censé ne pas abîmer l'état de surface de l'objet scanné

en raison des très faibles forces appliquées. Ces images topographiques ont permis de démontrer que le PTFE PDA S/L présente bien des fibrilles qui sont enrobées de particules de PDA mesurant entre 35 et 60 nm (**Figure 3.7.1**). Par contre, le PTFE PDA A/E est recouvert d'un film continu (entre les fissures) composé de particules de PDA de la même taille (**Figure 3.7.2**). Nous avons également pu observer le film de PDA A/E à la surface du ePTFE à partir de coupes transversales en MET : ce film mesure environ 80 nm d'épaisseur (**Figure 3.7.3**).

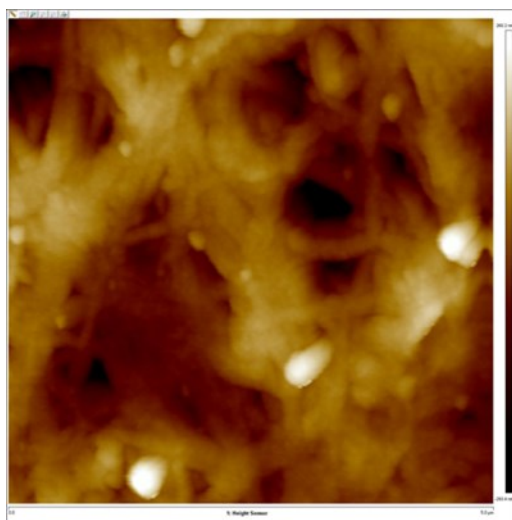


Figure 3.7.1 : Image topographique obtenue par AFM de la surface du PTFE PDA S/L. Les fibrilles de PTFE enrobées de particules de PDA sont clairement identifiables.

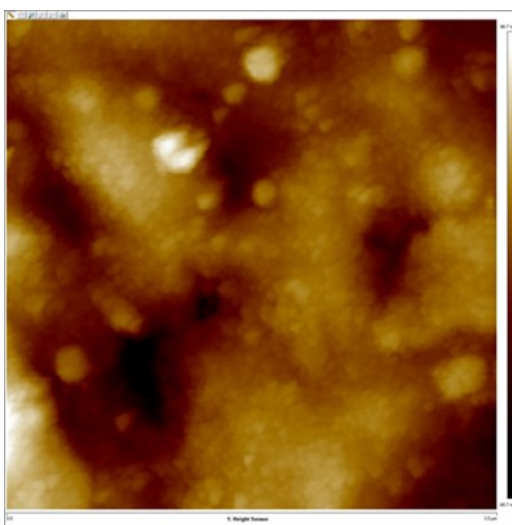


Figure 3.7.2 : Image topographique obtenue par AFM de la surface du PTFE PDA A/E. Le biomatériau est recouvert d'un mince film granulaire de PDA.

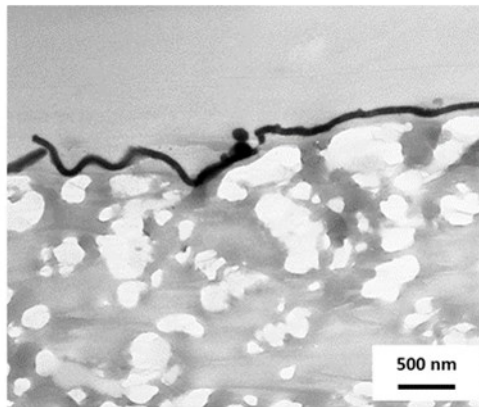


Figure 3.7.3 : La coupe transversale du PTFE PDA A/E déposé sur du ePTFE démontre que ce biomatériau poreux est recouvert d'un film de PDA mesurant entre 60 et 80 nm d'épaisseur (MET).

Les propriétés mécaniques (module d'élasticité) ont également été mesurées pour les trois conditions : ePTFE vierge (**Figures 3.8.1, 3.8.2**) (n=20), PTFE PDA S/L (**Figure 3.8.3**) (n=14), PTFE PDA A/E (**Figure 3.8.4**) (n=33).

Le ePTFE présente une composition bien spécifique avec des fibrilles qui se croisent en formant des nœuds (**Figure 3.8.1**, étoiles). 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), présenté en **Figure 3.8.2**, révèle une répartition bimodale de l'élasticité. Des résultats similaires sont obtenus pour le PTFE PDA S/L (**Figure 3.8.3**) et le PTFE PDA A/E (**Figure 3.8.4**). Cette distribution bimodale des différents histogrammes traduit l'hétérogénéité (nœuds/fibres) du ePTFE. Les analyses statistiques ne laissent pas apparaître de différences significatives ($p=0,484$) entre les modules de Young des trois surfaces, à savoir le ePTFE vierge, le PTFE PDA S/L et le PTFE PDA A/E. Ces résultats suggèrent donc que les deux méthodes de fonctionnalisation ne modifient pas les propriétés mécaniques intrinsèques du biomatériau.

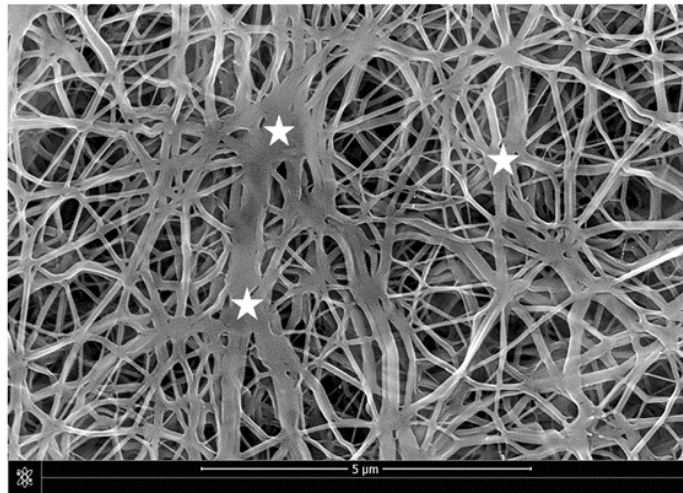


Figure 3.8.1 : Micrographie de MEB montrant les hétérogénéités de la surface du ePTFE. Étoiles = noeuds interfibrillaires.

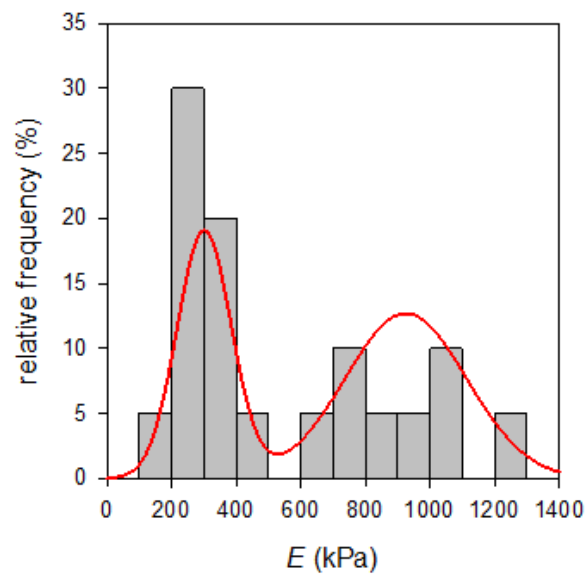


Figure 3.8.2 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du ePTFE vierge (n=20).

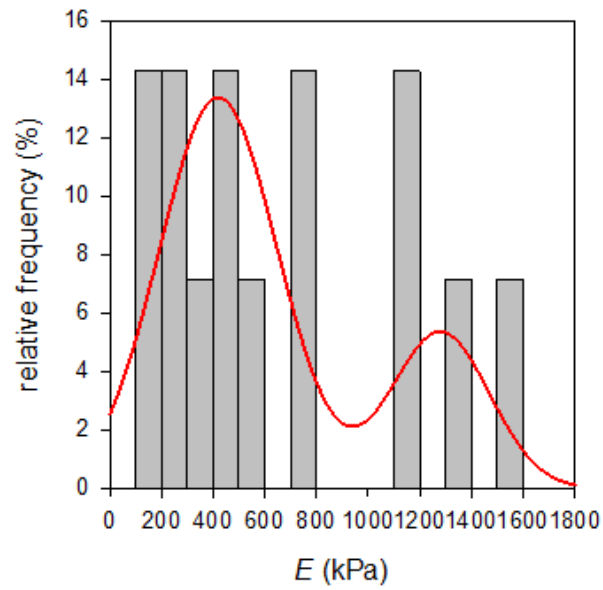


Figure 3.8.3 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du PTFE PDA S/L (n=14).

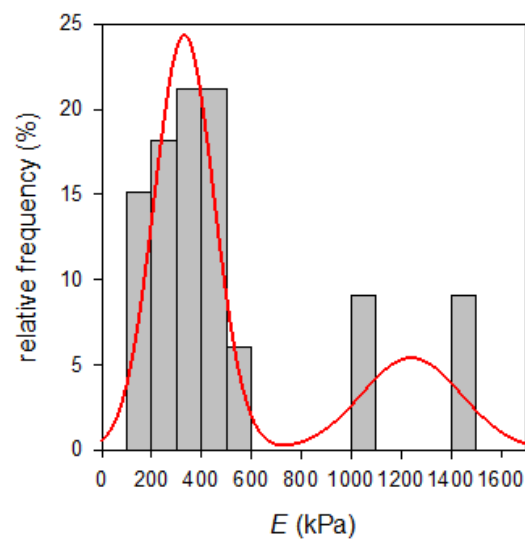


Figure 3.8.4 : Histogramme montrant une répartition bimodale des mesures du module de Young E du PTFE PDA A/E (n=33).

En conclusion, il nous a été possible de mettre en évidence un mécanisme de nucléation hétérogène de la PDA. Il apparaît que les films de PDA A/E et de PDA S/L sont chimiquement équivalents. Par contre, le film de PDA A/E croît plus rapidement que le dépôt de PDA S/L. La technique de transfert par la méthode de Langmuir-Schaeffer permet de recouvrir plus ou moins tout substrat plan et de le rendre (plus) hydrophile. Cette approche fonctionne très bien pour notre application 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 ePTFE. 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).⁷⁹

III) 2) Évaluation biologique du PTFE fonctionnalisé avec la polydopamine

III) 2) a) Analyses *in vitro* en microscopie électronique : protocoles expérimentaux

Les substrats utilisés sont des petits morceaux de ePTFE (Dualmesh® W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ) de 1 mm d'épaisseur et 1cm² de surface.

Les deux méthodes de fonctionnalisation avec la PDA ont été testées sur le ePTFE : le PDA S/L et le PDA A/E. Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau distillée (Milli Qplus system). La dissolution de la dopamine dans le tampon Tris est réalisée juste avant le début de la réaction, pour les deux modes de fonctionnalisation. Le temps de fonctionnalisation est de 3 heures.⁷⁸ Puis les ePTFE fonctionnalisés sont rincés à l'eau purifiée, séchés et autoclavés.

Les cultures cellulaires sont menées comme décrites précédemment dans le chapitre II) 2), en utilisant les deux types cellulaires : principalement les fibroblastes dermiques humains mais aussi les cellules souches de la gelée de Wharton (WJ-SC). Les analyses sont menées en microscopie électronique (MEB, ESEM, MET) et en AFM.

III) 2) b) Résultats

Les observations par MET ont permis de montrer des fibroblastes avec des noyaux ellipsoïdes typiques à la surface des ePTFE fonctionnalisés. La présence du réticulum endoplasmique en quantité importante traduit l'activité de synthèse des cellules (**Figure 3.9**). Il est cependant intéressant de noter en ESEM la différence dans le comportement cellulaire entre le ePTFE vierge et le PTFE PDA S/L. En effet, sur le ePTFE vierge, nous pouvons observer des cellules non étalées, isolées et en plus faible nombre (**Figure 3.10.1**). Au contraire, sur le PTFE PDA S/L, on note un étalement généralisé des cellules (**Figure 3.10.2**).

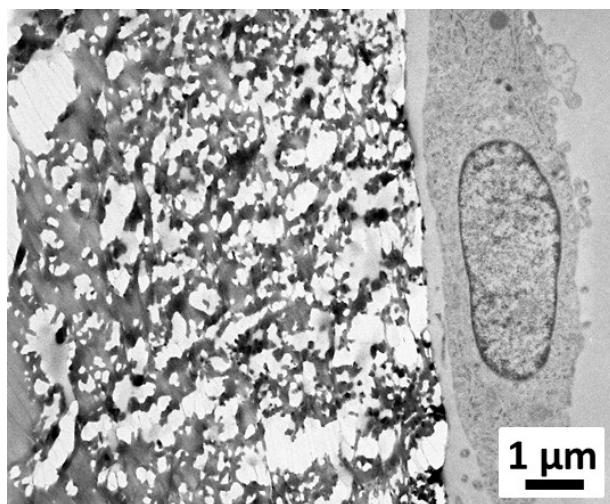


Figure 3.9 : Micrographie de MET montrant un fibroblaste à la surface du ePTFE PDA S/L.

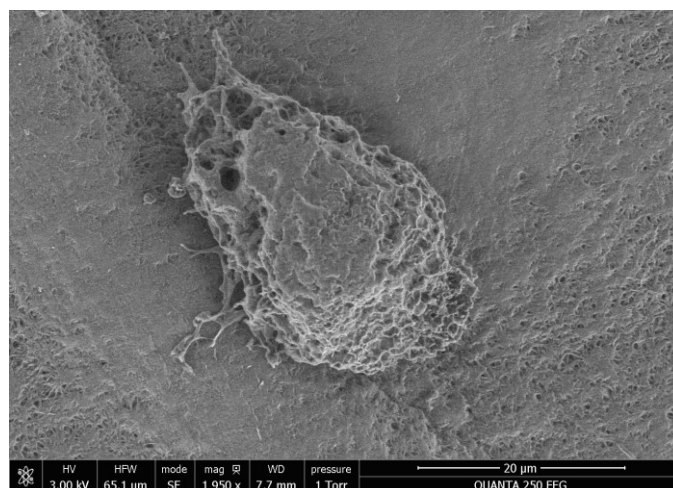


Figure 3.10.1 : Micrographie de ESEM montrant une cellule souche de la gelée de Wharton (WJ-SC) à la surface du ePTFE vierge.

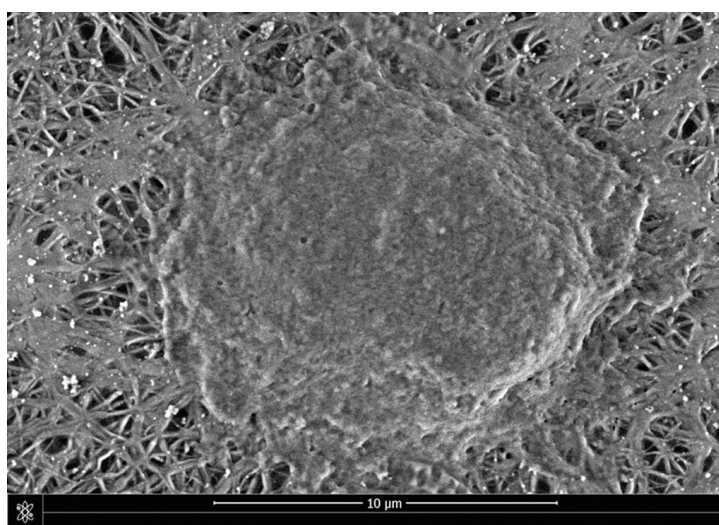


Figure 3.10.2 : Micrographie de ESEM d'une cellule WJ-SC à la surface du PTFE PDA S/L. Noter l'étalement de la cellule à la surface du ePTFE fonctionnalisé.

Les analyses des cultures cellulaires effectuées sur le PTFE PDA A/E révèlent un contact étroit entre le tapis cellulaire et le film de PDA A/E (**Figures 3.11.1, 3.11.2**). De plus, l'AFM en mode

image nous a permis de visualiser la présence de fibres de collagène synthétisées par les fibroblastes tapissant la surface du film PDA A/E (**Figure 3.11.2, insert**). Les nombreux points focaux cellulaires traduisent la fixation des fibroblastes au film de PDA A/E (**Figure 3.11.3**). Nous avons décrit précédemment la fragilité du film PDA A/E. Ainsi, lorsqu'une culture cellulaire est réalisée à la surface d'un PTFE PDA A/E imparfaitement fonctionnalisé (avec des interruptions locales du film), nous avons observé que les cellules se développent préférentiellement à la surface des parties recouvertes par du film de PDA et pas sur le ePTFE non fonctionnalisé. De plus, ces cellules WJ-SC envoient des projections cytoplasmiques en direction des fragments de film de PDA (**Figure 3.11.4**).

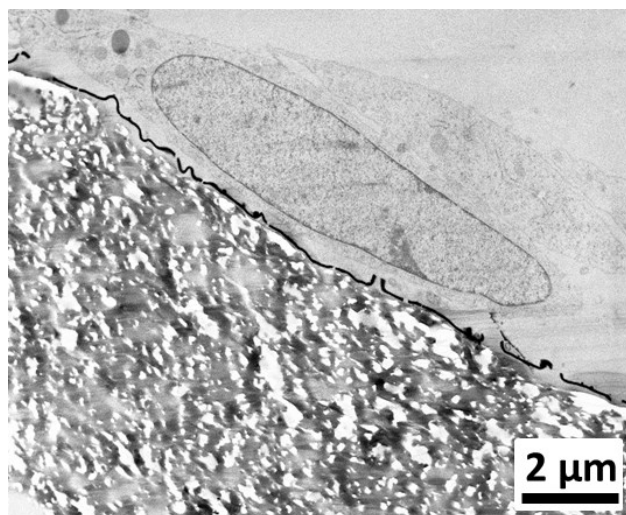


Figure 3.11.1 : Micrographie de MET montrant une cellule fibroblastique en étroit contact avec le film PDA A/E recouvrant du ePTFE.

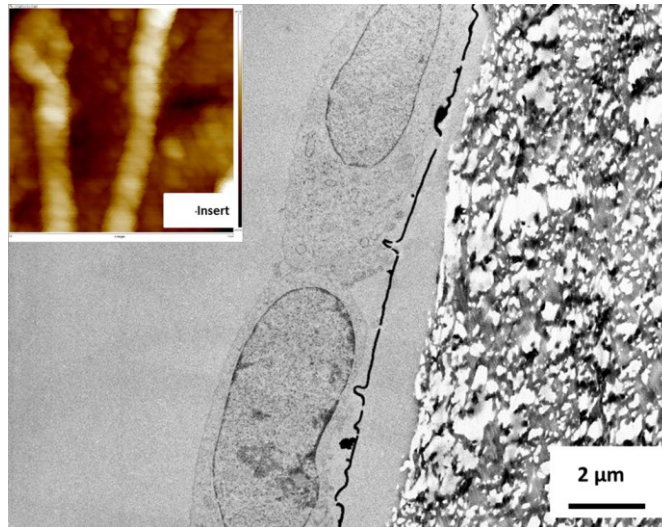


Figure 3.11.2 : Vue du tapis cellulaire en contact avec le film de PDA A/E. **Insert** : image AFM de « hauteur » de deux fibres de collagène synthétisées par des fibroblastes recouvrant le PTFE PDA A/E.

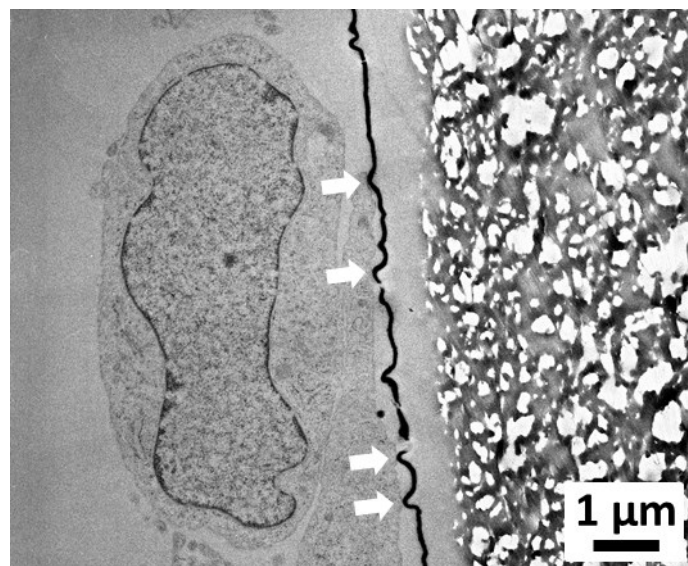


Figure 3.11.3 : Micrographie de MET montrant de nombreux points de contact focaux entre les fibroblastes primaires et le film PDA A/E.

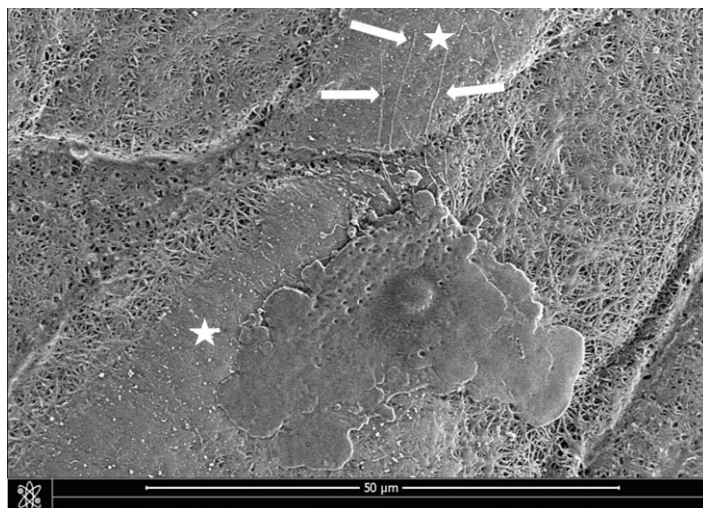


Figure 3.11.4 : Micrographie de ESEM d'une cellule de la gelée de Wharton (WJ-SC) étalée préférentiellement à la surface du film intact de PDA A/E. Les flèches marquent des filopodes de la WJ-SC en direction d'une autre zone fonctionnalisée par le film de PDA (étoiles).

III) 2) c) Discussion

Pour diminuer le taux de récurrence herniaire, une des voies d'amélioration envisageable est la stimulation de l'intégration tissulaire de la prothèse. Nous avons démontré précédemment que cette prothèse en ePTFE n'était que partiellement colonisée. Des modifications de texture ont été proposées jusqu'à présent par le fabricant afin d'atteindre cet objectif en proposant une prothèse avec deux faces distinctes. En effet, la structure poreuse facilite l'intégration tissulaire de l'implant.⁶⁴ D'autres auteurs ont également démontré que la réponse tissulaire dépend de la structure de la surface de la prothèse.⁵⁶⁻⁵⁷

Nous avons donc proposé deux techniques de fonctionnalisation du ePTFE utilisant la PDA. La 1^{ère} méthode consiste à immerger le biomatériau dans une solution de PDA. Les observations MEB ont montré que ceci entraîne un épaissement des fibrilles de PTFE enrobées de PDA et donc une

diminution de la porosité du biomatériau (**Figure 3.6.2**). La seconde méthode de fonctionnalisation consiste à déposer un film de PDA sur une seule des deux faces de la prothèse (**Figure 3.6.3**). En MEB et AFM, nous avons pu vérifier que les deux méthodes de fonctionnalisation résultent de la coalescence de nanoparticules de PDA (**Figures 3.6.4, 3.7.1, 3.7.2**). Le film de PDA A/E mesurant moins de 100 nm d'épaisseur épouse parfaitement la surface irrégulière poreuse du ePTFE (**Figure 3.7.3**). Etant donné la taille nanométrique de cette fonctionnalisation, cette diminution de porosité est donc négligeable. Nous avons démontré que les deux méthodes de fonctionnalisation sont tout aussi efficace l'une que l'autre. Cependant, l'intérêt spécifique de la seconde méthode est la fonctionnalisation d'une seule des deux faces : la technique de transfert du film de PDA par la méthode de Langmuir-Schaeffer permet de produire des implants avec des propriétés de surface différentes. Par conséquent, cette approche originale permet d'utiliser une prothèse en ePTFE, où la face fonctionnalisée avec le film de PDA favorise l'intégration tissulaire sur le versant thoracique, alors que le PTFE brut de l'autre face s'oppose à la formation d'adhérences sur le versant abdominal.

Etant donné que les propriétés mécaniques d'un substrat peuvent influencer le comportement et la différenciation cellulaire⁶⁷, il nous a semblé pertinent de mesurer les modifications possibles des propriétés mécaniques de surface du ePTFE suite à sa fonctionnalisation. La texture du biomatériau montre deux zones distinctes : des fibrilles (régions poreuses) et des nœuds (**Figure 3.8.1**). L'histogramme des modules de Young mesurés sur du ePTFE vierge confirme cette hétérogénéité de surface par une distribution bimodale de l'élasticité (**Figure 3.8.2**). Pour le PTFE PDA S/L, les mesures d'élasticité montrent également une distribution bimodale des valeurs des modules de Young similaire au ePTFE vierge (**Figure 3.8.3**). Néanmoins, il semble que les valeurs des modules de Young soient légèrement plus élevées pour le PTFE PDA S/L par rapport à l'ePTFE vierge. Mais il apparaît que cette augmentation constatée de la dureté du biomatériau n'est pas statistiquement significative. Les résultats des mêmes mesures conduites sur le PTFE PDA A/E nous ont surpris. En effet, bien que le film PDA A/E recouvre l'architecture de surface du ePTFE (**Figure 3.6.3**), cachant ainsi la distribution de nœuds parmi le réseau fibrillaire, une distribution bimodale de l'élasticité est toujours présente (**Figure 3.8.4**). Et dans ce cas aussi, on ne note pas de différence significative avec

les mesures enregistrées pour le ePTFE vierge. Nous pouvons ainsi en conclure que des réponses cellulaires différentes, notées entre le biomatériau utilisé brut ou fonctionnalisé, ne seront pas dues à des modifications des propriétés mécaniques du ePTFE par les deux méthodes de fonctionnalisation à la PDA.

Nous avons également analysé en microscopie électronique (MET et MEB) le comportement cellulaire de fibroblastes primaires et de cellules souche de la gelée de Wharton cultivés sur le ePTFE vierge et sur du biomatériau fonctionnalisé. Nous avons déjà souligné précédemment le défi que représentait la préparation d'échantillons à partir d'interfaces intactes entre le ePTFE, très mou, et le matériel cellulaire à sa surface.^{48, 57-59} La mise au point d'une technique de préparation spécifique pour l'ultramicrotomie nous a cependant permis de lever ce verrou technologique et d'analyser les réponses biologiques aux interfaces. On peut aussi rappeler les avantages qu'apporte l'étude en microscopie électronique à balayage en mode environnemental (ESEM) des échantillons de biomatériau avec du matériel biologique. En effet, l'ESEM permet de s'affranchir des étapes de déshydratation et de métallisation des spécimens, donc d'éviter des artefacts inhérents aux techniques de préparation conventionnelles pour la microscopie électronique à balayage. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un contact étroit entre le revêtement cellulaire et le PTFE fonctionnalisé en solution (**Figure 3.9**), ainsi qu'un excellent étalement cellulaire (**Figure 3.10.2**). Les analyses MET ont permis de montrer des résultats similaires pour le PTFE PDA A/E (**Figures 3.11.1, 3.11.2**), ainsi que la présence de multiples points de contact focaux entre les cellules et le film de PDA (**Figure 3.11.3**). Les observations par AFM ont révélé des fibres de collagène à proximité de fibroblastes étalés à la surface du PTFE fonctionnalisé (**Figure 3.11.2 insert**), ce qui démontre l'activité de synthèse des cellules au contact du biomatériau modifié.

Conclusion du chapitre 3

Notre étude a montré que la fonctionnalisation du ePTFE avec de la PDA est une approche aussi innovante que prometteuse. Les deux modes de modification proposés (PDA A/E et PDA S/L) sont simples à réaliser, peu coûteux et favorables à l'intégration tissulaire de l'implant. De plus, la possibilité de pouvoir recouvrir une seule face du biomatériau avec un film de PDA A/E, par la méthode de Langmuir-Schaeffer, est particulièrement intéressante pour les applications chirurgicales visées dans le présent travail. En effet, la possibilité de pouvoir produire un biomatériau double-face permet de guider les réponses de l'hôte : une intégration tissulaire du côté thoracique et la non-adhérence des tissus du côté abdominal. Les cultures cellulaires (fibroblastes primaires et cellules souches) *in vitro* que nous avons réalisées sur les biomatériaux modifiés (PDA A/E et PDA S/L) se révèlent encourageantes. Dans les deux cas de figure, les images de microscopie montrent un effet favorable sur les développements cellulaires de la fonctionnalisation par la PDA. Cet impact sur la réponse cellulaire laisse entrevoir une optimisation de la prothèse avec la perspective d'une meilleure intégration tissulaire à long terme de l'implant. À l'évidence, le film de PDA A/E, déposé par la méthode de Langmuir-Schaeffer, présente encore une certaine fragilité (apparition de fissures), mais des perspectives d'amélioration existent et sont explorées par d'autres équipes.

L'objectif de ce troisième chapitre était d'explorer une voie de fonctionnalisation simple et efficace du biomatériau actuellement utilisé en pratique clinique pour le remplacement diaphragmatique. Le chapitre suivant aborde le volet mécanistique appliqué au traitement de la HDC et ouvre la voie vers des prothèses innovantes.

Chapitre 4 : Aspects biomécaniques et perspectives

Aspects biomécaniques et perspectives

IV) 1) Approche mécanistique des récurrences herniaires

IV) 1) a) Généralités

IV) 1) a) 1. Etat des lieux

IV) 1) a) 2. Protocoles expérimentaux

IV) 1) b) Caractérisation mécanique du diaphragme sur un modèle animal

IV) 1) b) 1. Méthodologie

IV) 1) b) 2. Résultats

IV) 1) b) 3. Conclusion

IV) 1) c) Caractérisation mécanique de l'implant en ePTFE

IV) 1) c) 1. Méthodologie

IV) 1) c) 2. Résultats des essais de traction de la membrane de ePTFE

IV) 1) c) 3. Microscopie électronique à balayage du ePTFE sous étirement

IV) 1) d) Faisabilité d'un test de gonflement de la partie tendineuse du diaphragme

IV) 1) d) 1. Méthodes expérimentales

IV) 1) d) 2. Résultats

IV) 1) d) 3. Perspectives

IV) 2) Développement de nouveaux biomatériaux pour le traitement de la HDC

IV) 2) a) Technique d'électrofilage (electrospinning)

IV) 2) b) Description des premiers prototypes

IV) 2) b) 1. Utilisation du polyamide-6

IV) 2) b) 2. Utilisation du polyuréthane

IV) 2) c) Comparaison des premiers prototypes réalisés et perspectives

IV) 1) Approche mécanistique des récives herniaires

IV) 1) a) Généralités

IV) 1) a) 1. Etat des lieux

Le traitement par remplacement prothétique des HDC à large défaut est source de récive : nous avons notamment discuté dans le chapitre I les causes liées à la croissance de l'enfant. Notre étude tomodensitométrique a défini un facteur de croissance de la surface d'une coupole diaphragmatique de 4 à 5 fois entre la petite enfance et l'adolescence ; ce qui correspond à une déformation uni-axiale d'environ 100%.⁴⁸

Afin de définir le cahier des charges de la prothèse idéale, il était essentiel de connaître les propriétés mécaniques du diaphragme biologique normal. En effet, un matériel prothétique de remplacement doit s'approcher, autant que faire se peut, sinon mimer les propriétés biomécaniques du tissu à réparer, au risque de ne pas restaurer sa fonction, en l'occurrence, la ventilation. Peu de données sur la mécanique du diaphragme chez l'homme sont disponibles dans la littérature. À notre connaissance, une seule étude de traction uni-axiale a été réalisée sur la partie tendineuse de diaphragmes de cadavres de nouveaux-nés vs. d'adolescents. Selon ce travail, il existe une contrainte maximale plus élevée dans le groupe des 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, les différences observées ne sont pas statistiquement significatives sans doute à cause du nombre limité de cas ($n=13$).⁸⁰ En utilisant le modèle biomécanique du diaphragme basé sur la méthode des éléments finis cité précédemment, les différents calculs en simulation donnent un module de Young similaire (33,0 MPa pour la partie tendineuse et 5,3 MPa pour la partie musculaire).²⁴ Néanmoins, les données issues de cet article sont des ordres de grandeur, car ce n'est pas le comportement "matériaux" du

diaphragme qui est étudié : le diaphragme est considéré comme un solide élastique compressible et ces résultats sont obtenus à partir de simulations.

Afin de pouvoir comparer les propriétés des biomatériaux que nous allons tester ultérieurement (ePTFE vs. nouveaux biomatériaux), nous avons réalisé une étude de traction uni-axiale, sur les portions tendineuses de diaphragmes de porc. L'étude du tendon a été privilégiée car le diaphragme présente principalement une structure tendineuse.¹⁴ Ces tests ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Doctorat de Elham Mohsenzade avec une soutenance prévue fin 2017 au sein de l'équipe du Laboratoire de Physique et Mécanique Textiles (LPMT) (EAC 7189) à Mulhouse et en collaboration avec l'équipe du Laboratoire ICube, Département de mécanique MMB (Matériaux Multi Echelles et Biomécanique) de Strasbourg.

IV) 1) a) 2. Protocoles expérimentaux

Préparation des éprouvettes

Les tests de traction ont été réalisés sur du matériel frais non congelé, partie tendineuse des coupes diaphragmatiques droite et gauche de porc adulte, prélevé dans des conditions réglementaires au Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, et sur les différents biomatériaux. Etant donné l'absence de norme décrite dans la littérature concernant les tests mécaniques sur le diaphragme, nous avons suivi par souci de comparabilité les normes européennes EN ISO 527-3 pour des films d'épaisseur ≤ 1 mm (*Plastiques – Détermination des propriétés en traction – Partie 3: Conditions d'essai pour films et feuilles* (ISO 527-3 : 1995)) ; ces normes seront appliquées ultérieurement aux différents biomatériaux testés. Certains auteurs ont déjà publié leurs résultats concernant les tests de traction uni-axiale sur des modèles animaux appliqués à la HDC, mais ces tests ne respectent pas les normes.^{71, 81-82}

La longueur initiale (longueur entre les mors) est définie selon la norme EN ISO 527-3 comme devant être de 100 mm. Malheureusement, il est impossible de produire les biomatériaux décrits ultérieurement à cette dimension ; nous avons ainsi fait le choix de réduire cette longueur initiale à 20 mm pour toutes les éprouvettes, ceci en respectant cependant le ratio $R = \text{largeur}/\text{longueur initiale}$ ($0,1 \leq R \leq 0,25$).

A cause du risque de dessèchement des tissus biologiques, nous réalisons la moyenne de l'épaisseur : trois mesures d'épaisseur sont réalisées sur trois éprouvettes à l'aide d'un microscope binoculaire (Euromex DZ series) et la moyenne est calculée.

Différents types de fixation des éprouvettes ont été testés lors de mesures préliminaires et il s'est avéré que la fixation par de la colle cyanoacrylate sur un cadre en papier de verre était le plus efficace pour éviter les phénomènes de glissement (**Figure 4.1**).

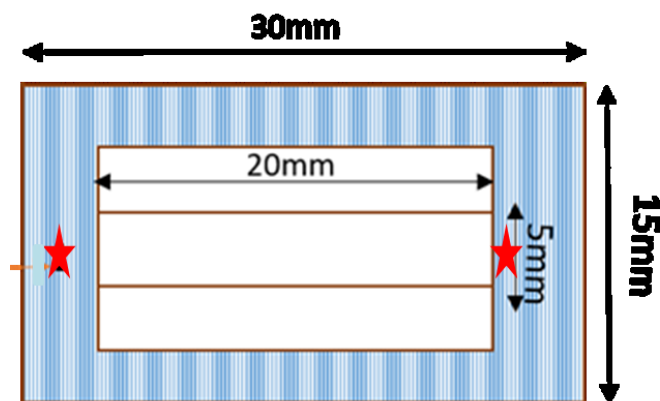


Figure 4.1 : Méthode de fixation d'une éprouvette pour l'essai de traction uni-axiale (étoiles : point de colle).

Conditions expérimentales

Les essais de traction uni-axiale sont réalisés sur une machine de traction MTS, équipée d'une cellule de force de 100 N, à une vitesse de 5 mm/min. Tous les essais sont réalisés dans les mêmes conditions. Afin de contrôler la température et de la maintenir proche de la température corporelle, une chambre environnementale Instron 3119.005 est installée sur la machine de traction MTS. Afin d'augmenter l'humidité pendant l'essai, des mousses imbibées d'eau ont été ajoutées dans la chambre. Tous les tests sont réalisés à une température moyenne de 36,8°C et un taux d'humidité moyen de 83%. Seuls les meilleurs résultats, c'est-à-dire sans glissement, sont analysés, avec au minimum cinq éprouvettes. Le comportement de chaque éprouvette est relevé pendant le test.

Analyse des résultats

La force F est donnée en newton (N) ; A correspond à l'unité de surface de la section de l'éprouvette, en mm^2 ; L_0 définit la longueur initiale entre les mors et ΔL l'allongement en mm.

Pour les petites déformations, les courbes de contrainte ingénieure σ_I en MPa ($\sigma_I = F / A$) en fonction de la déformation ingénieure ε_I ($\varepsilon_I = (\Delta L / L_0) \times 100$) sont calculées. Nous pouvons en déduire la contrainte maximale avant rupture ($\sigma_v = \sigma_I \times (1 + \varepsilon_I)$) et le module de Young E en MPa ($E = \sigma / \varepsilon$) calculé sur la partie linéaire de la courbe contrainte/déformation ingénieure (**Figure 4.2**).

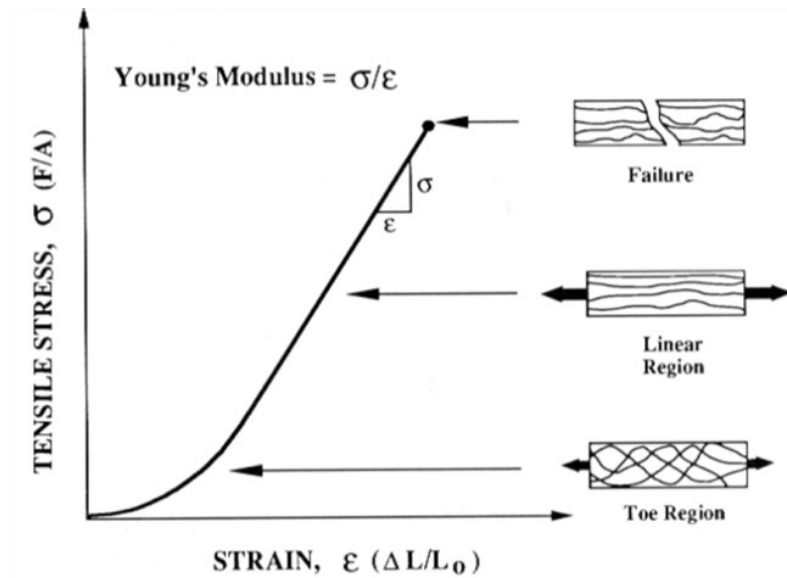


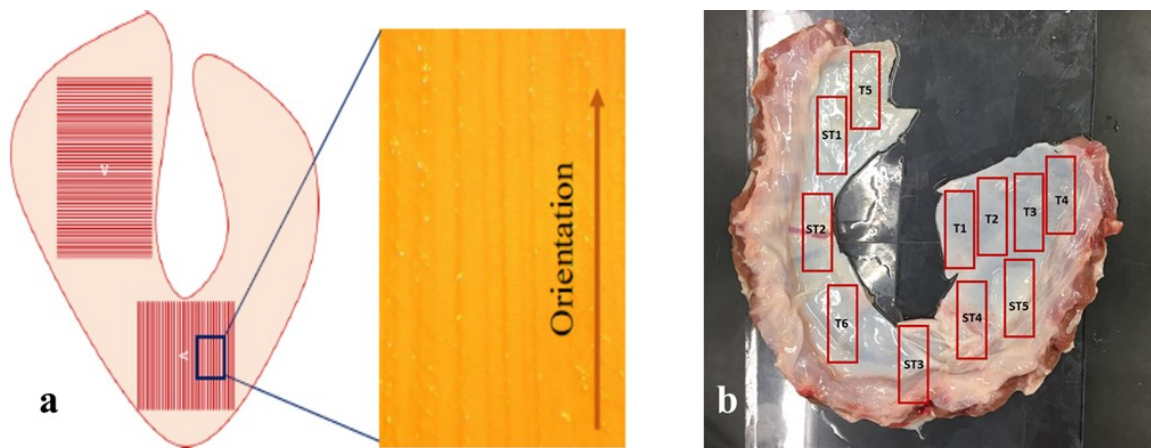
Figure 4.2 : Exemple de courbe de contrainte σ / déformation ϵ ingénierue et calcul du module de Young (σ/ϵ) d'un tissu biologique.⁸³

IV) 1) b) Caractérisation mécanique du diaphragme sur un modèle animal

IV) 1) b) 1. Méthodologie

Les éprouvettes sont préparées comme décrit précédemment et prélevées sur les portions tendineuses. L'épaisseur moyenne est de 0,54 mm.

Le diaphragme est un tissu anisotrope.^{45, 84-85} Les fibres de collagène présentent des orientations différentes selon la localisation du prélèvement (**Figures 4.3**) et par conséquent, les propriétés mécaniques varient suivant la direction.



Figures 4.3 : a) Orientation des fibres de collagène dans la partie tendineuse du diaphragme de porc b) Découpe des éprouvettes dans le centre tendineux d'un diaphragme frais de porc adulte.

IV) 1) b) 2. Résultats

Quelques courbes de contrainte/déformation sont présentées dans la **Figure 4.4**. Pour la partie tendineuse, l'analyse des courbes montre une contrainte rationnelle maximale moyenne de 4,6 MPa ($\pm 1,2$) et une déformation ingénieure maximale moyenne de 38,3 % ($\pm 12,9$). Le module d'élasticité moyen est de 13,7 MPa ($\pm 4,6$). Ces résultats sont comparables à ceux décrits dans la littérature et en particulier les résultats concernant les tests mécaniques sur la partie tendineuse des diaphragmes de cadavres d'enfants.^{24, 80}

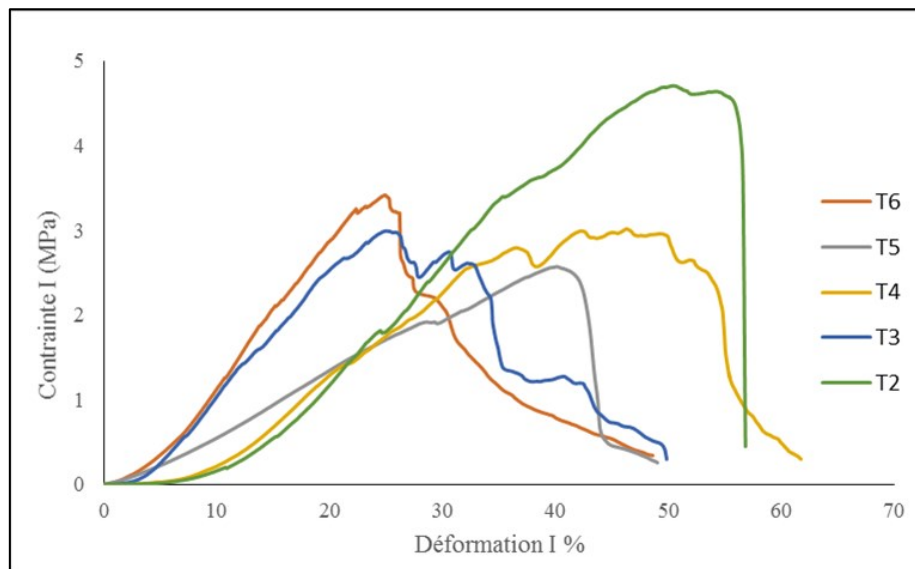


Figure 4.4 : Courbes de contrainte/déformation ingénierue de différentes éprouvettes de la partie tendineuse du diaphragme de porc.

IV) 1) b) 3. Conclusion

Le centre tendineux du diaphragme constitue un matériau anisotrope.⁸⁴ Au début des tests de traction uni-axiale, la première zone de la courbe est liée à l'orientation anarchique des fibres de collagène relâchées. La deuxième zone traduit la réorganisation des fibres de collagène dans l'axe de la traction. Ainsi, en augmentant encore davantage la contrainte, la courbe présente une partie linéaire qui traduit la composante élastique des tissus. Dans la troisième zone, on peut observer les ruptures microscopiques qui correspondent à la rupture de chaque fibre orientée l'une après l'autre pour finalement aboutir à la rupture macroscopique (**Figure 4.2**).⁸⁶

L'ensemble des tests a montré une similitude entre la coupole diaphragmatique droite et gauche. Les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits dans les quelques articles publiés à partir de travaux menés chez l'homme. Ces données nous permettront de situer les résultats obtenus sur le ePTFE et les biomatériaux nouvellement développés.

IV) 1) c) Caractérisation mécanique de l'implant en ePTFE

IV) 1) c) 1. Méthodologie

Les éprouvettes sont préparées comme décrit précédemment. Deux types d'éprouvettes différentes sont définis selon l'orientation des bandes sur la face rugueuse du ePTFE : groupe 01, perpendiculaire à l'axe et groupe 02, parallèle à l'axe (**Figure 4.5**). L'épaisseur moyenne pour les deux groupes est la même (0,48 mm).

Les essais de traction uni-axiale sont menés dans les mêmes conditions que pour les tissus biologiques.

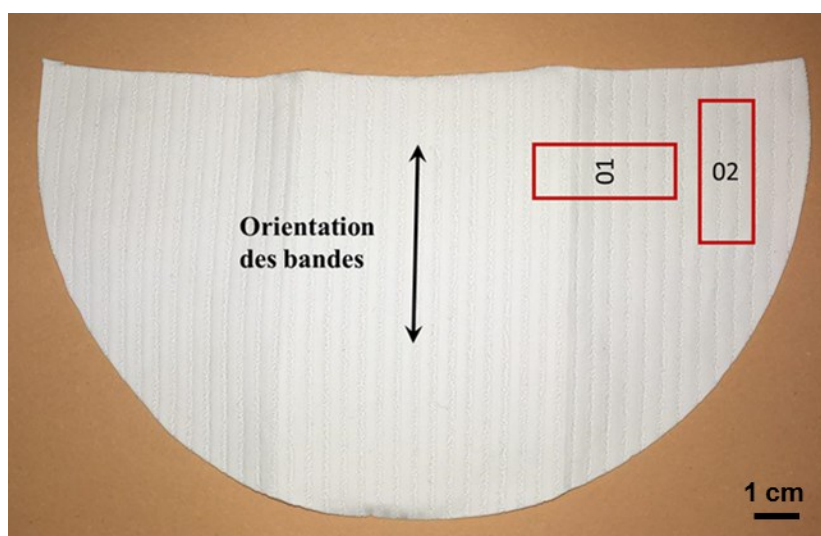


Figure 4.5 : Préparation des éprouvettes de ePTFE en fonction de l'orientation des bandes sur la face rugueuse (flèche : axe parallèle aux bandes rugueuses) : groupe 01 : perpendiculaire à l'axe (90°) ;
groupe 02 : parallèle à l'axe (0°).

IV) 1) c) 2. Résultats des essais de traction de la membrane de ePTFE

Quelques courbes de contrainte/déformation sont présentées dans la **Figure 4.6**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III**, avec dans la dernière colonne les résultats obtenus sur le diaphragme de porc : les résultats pour la contrainte, la déformation et le module de Young 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 électronique du ePTFE où nous avons pu observer que ce biomatériau n'est texturé qu'en surface sur sa face rugueuse (**Figure 2.1**) et que sa structure poreuse centrale est homogène (**Figure 2.4**).

	Groupe 01	Groupe 02	Diaphragme porc
Contrainte rationnelle maximale moyenne en MPa (écart-type en %)	27,9 (± 9,0)	29,8 (± 9,3)	4,6 (± 1,2)
Déformation ingénieure maximale moyenne en % (écart-type en %)	186,6 (± 75,1)	172,0 (± 44,3)	38,3 (± 12,9)
E en MPa (écart-type en %)	15,6 (± 1,0)	14,7 (± 0,8)	13,7 (± 4,6)

Tableau III : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du ePTFE (groupe 01 : 90° ; groupe 02 : 0°).

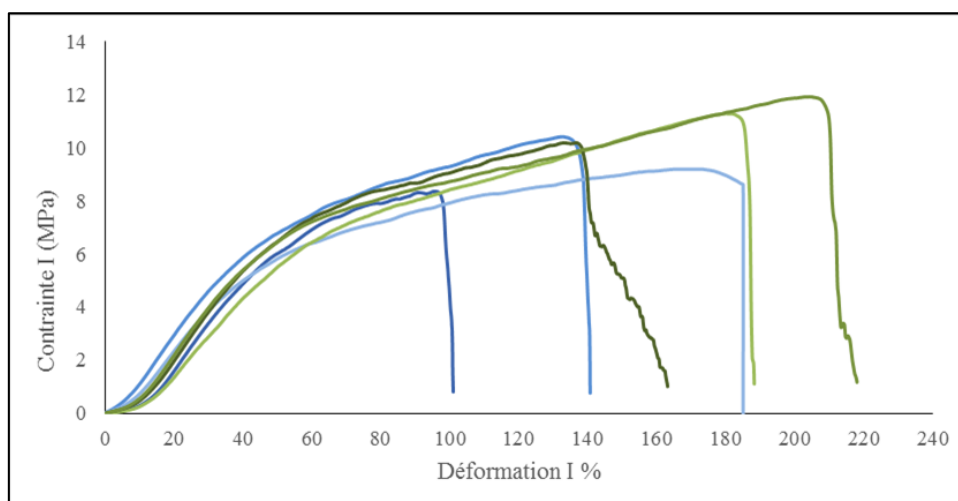


Figure 4.6 : Courbes de contrainte/déformation ingénieure du ePTFE en fonction de l’orientation des bandes à la surface de sa face rugueuse (groupe 01 : bleu ; groupe 02 : vert).

Ces courbes montrent bien le comportement linéaire initiale du ePTFE traduisant un comportement élastique où les fibrilles agissent potentiellement comme des structures élastiques. Puis, progressivement, le ePTFE passe à un comportement plastique, où la structure se rompt.⁵¹ Ces résultats sont en accord avec les données fournies par le fabricant puisqu’il est admis que le ePTFE peut se déformer en longueur jusqu’à 100% ou plus.⁵¹

Afin de comparer les résultats obtenus en test de traction sur les diaphragmes de porc et sur le ePTFE, nous avons superposé les courbes de contrainte/déformation ingénieure (**Figure 4.7**). On observe que, dans les deux cas de figure, on obtient des propriétés mécaniques élastiques du même ordre de grandeur. Toutefois, le ePTFE se déforme davantage que le diaphragme et est plus résistant à la traction. Il apparaît donc que le ePTFE est plus résistant à la force de traction que le diaphragme biologique (du porc). Remarquons cependant que, 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 minimales, 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 ePTFE. Il sera également essentiel de réaliser des essais de fluage et de relaxation pour comparer le comportement mécanique au long cours des biomatériaux au tissu biologique.

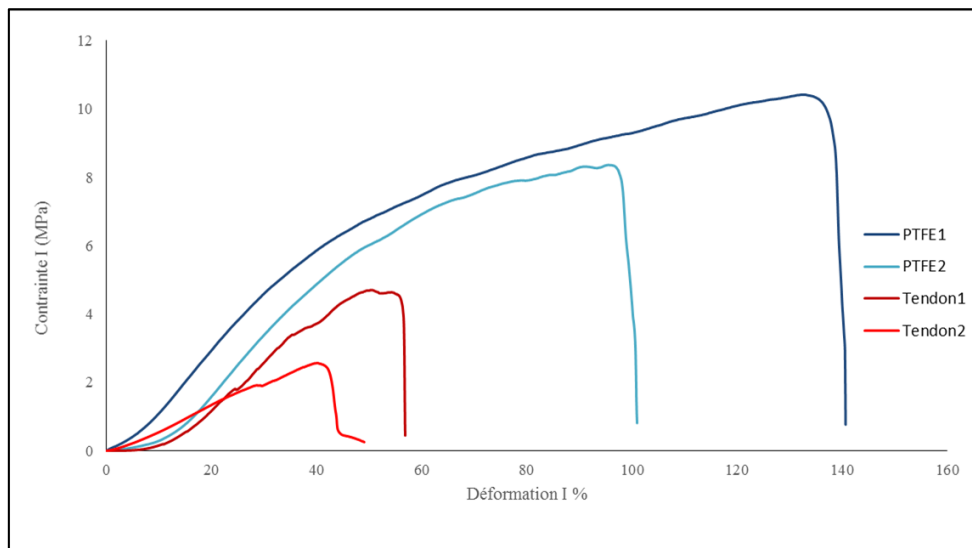


Figure 4.7 : Comparaison des courbes de contrainte/déformation ingénieur des diaphragmes de porc (rouge) et du ePTFE (bleu).

IV) 1) c) 3. Microscopie électronique à balayage du ePTFE sous étirement

Le ePTFE soumis à une traction uni-axiale, comme décrit précédemment, présente une déformation que nous avons analysée au MEB.

Sous l'effet des forces de traction, toutes les structures du ePTFE décrites précédemment prennent une orientation unidirectionnelle et le biomatériau laisse entrevoir une trame fibrillaire sous-jacente unique (**Figures 4.8.1, 4.8.2, 4.8.3**). Il existe une délamination progressive qui débute au niveau des bandes rugueuses (**Figure 4.8.3**). Dans la littérature, il est ainsi décrit une déstructuration du ePTFE avec une élongation des nœuds dans le sens de la traction et un allongement des fibrilles.⁵¹

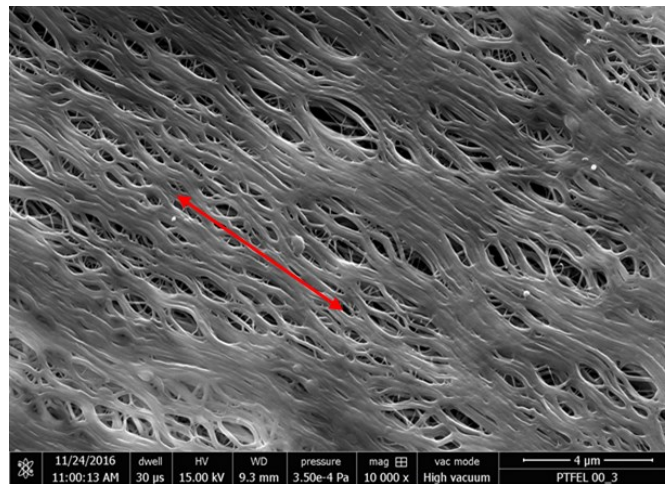


Figure 4.8.1 : Face lisse du Gore Tex Dual Mesh® après traction uni-axiale (flèche : axe d'étirement)
(MEB).

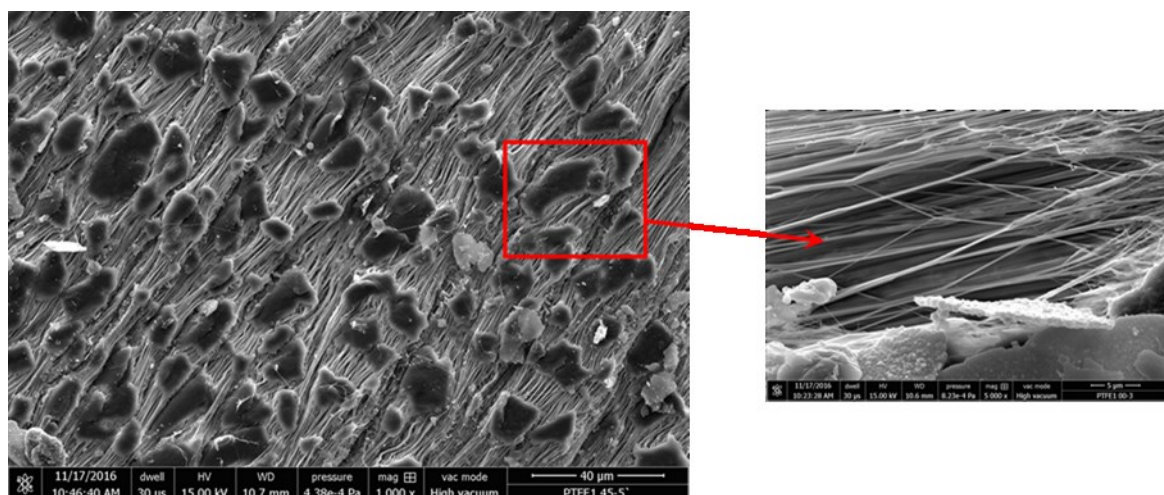


Figure 4.8.2 : Bande lisse de la face rugueuse du Gore Tex Dual Mesh® soumis à un étirement uni-axial (MEB). L'agrandissement de la figure de droite montre l'alignement des fibres de ePTFE.

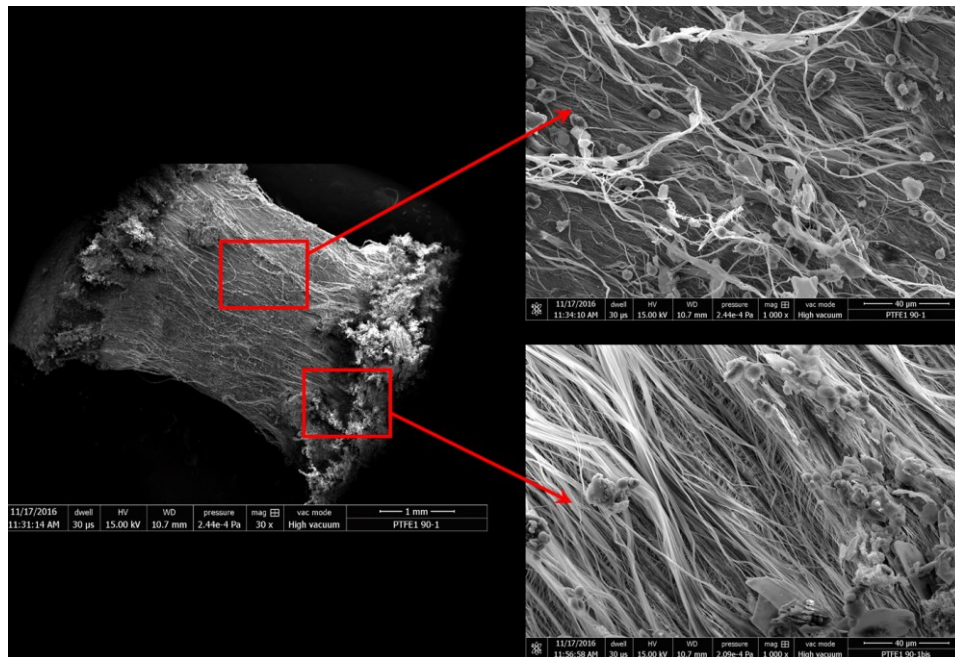


Figure 4.8.3 : Bande rugueuse de la face rugueuse du Gore Tex Dual Mesh® après traction uni-axiale (MEB). La figure de droite (haut) montre un agrandissement de la zone centrale de la bande rugueuse et la figure de droite (bas) montre un agrandissement de la zone de transition entre bande rugueuse et bande lisse où l’alignement des fibres est plus important.

IV) 1) d) Faisabilité d’un test de gonflement de la partie tendineuse du diaphragme

La traction uni-axiale est une technique expérimentale classique de caractérisation du comportement des tissus biologiques pour identifier et caractériser le comportement mécanique et les mécanismes de déformation des matériaux. Pour ce type de matériau, les courbes de contrainte en fonction de la déformation imposée ne fournissent pas toutes les informations permettant d'identifier le comportement anisotrope complexe du matériau biologique. Ainsi, nous nous sommes fixé comme objectif de développer un modèle de test de gonflement qui mimerait les contraintes appliquées à un diaphragme dans les conditions physiologiques. Ce travail a été réalisé par Christiane Wagner Kocher dans le cadre de son HDR dont la soutenance est prévue fin 2017, au Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC) - UMR 5508 à Montpellier.

IV) 1) d) 1. Méthodes expérimentales

Les éprouvettes sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce de diamètre 30 mm dans la partie tendineuse de diaphragmes de porcs adultes préalablement congelés. Les échantillons ont une partie utile circulaire de diamètre 10 mm. Ils sont fixés sur une rondelle « porte »-échantillon avec de la colle cyanoacrylate et maintenus entre des supports en plexyglass (**Figures 4.9 et 4.10**). La mise sous pression est réalisée avec du sérum physiologique injecté à l'aide d'un manomètre avec des paliers réguliers et progressifs de montée en pression (**Figures 4.11**). Les échantillons sont mouchetés en utilisant soit de la peinture, soit de la rouille mélangée à du graphite (**Figure 4.10**). L'expérimentation est instrumentée avec un capteur de pression et deux caméras qui permettent de reconstruire une image en 3D (le gradient de couleurs traduit les courbes de niveaux d'altitude) (**Figures 4.12**). Les mesures de pression et de déplacement sont synchronisées grâce à un logiciel Vic Snap (**Figures 5**).⁸⁷

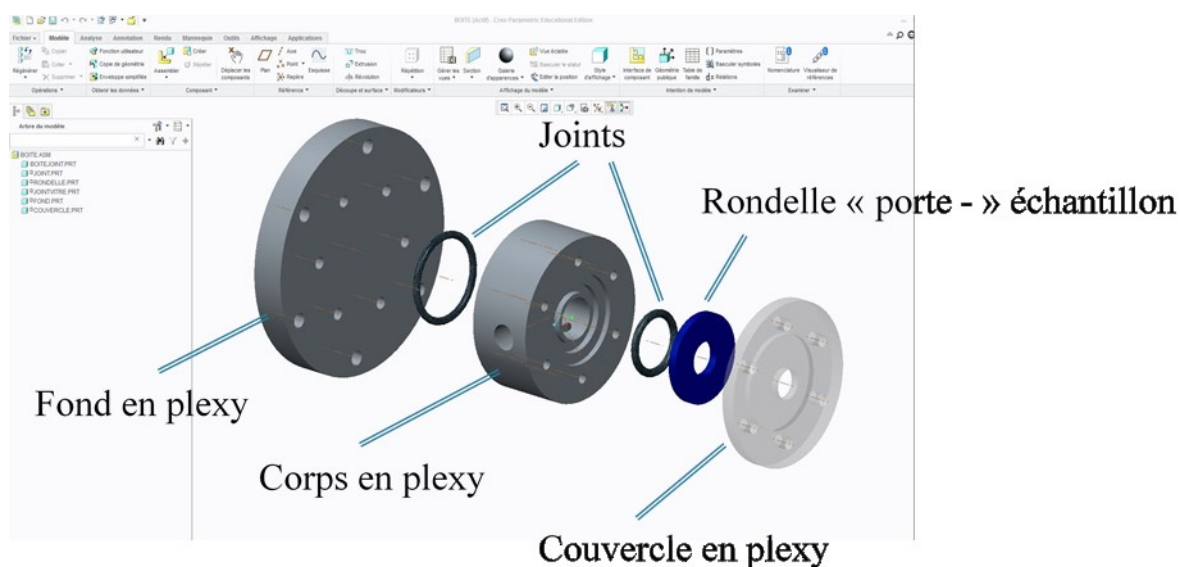


Figure 4.9 : Système de maintien de l'échantillon dans la chambre de mise sous pression.

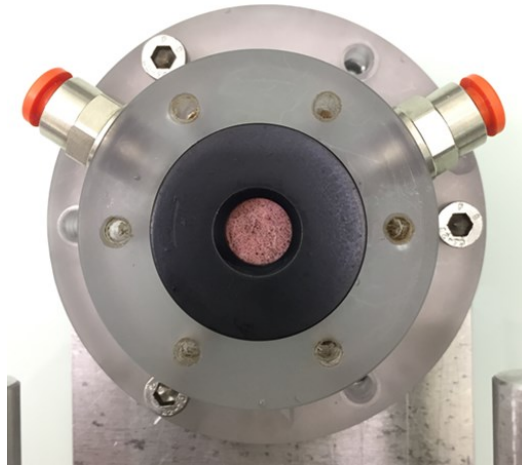
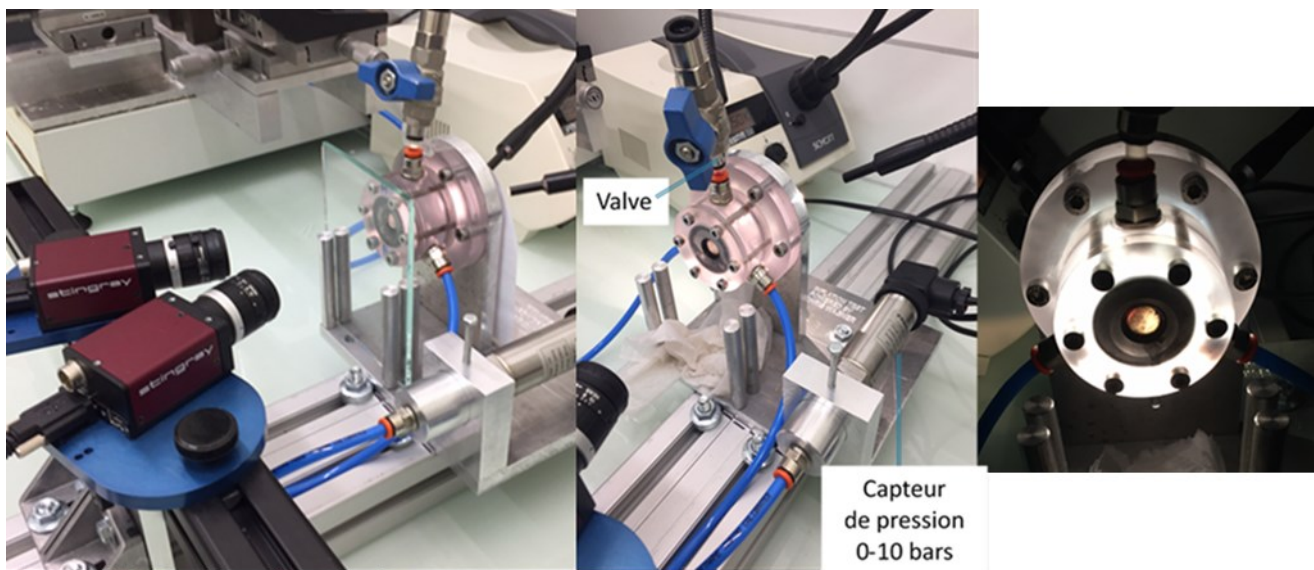
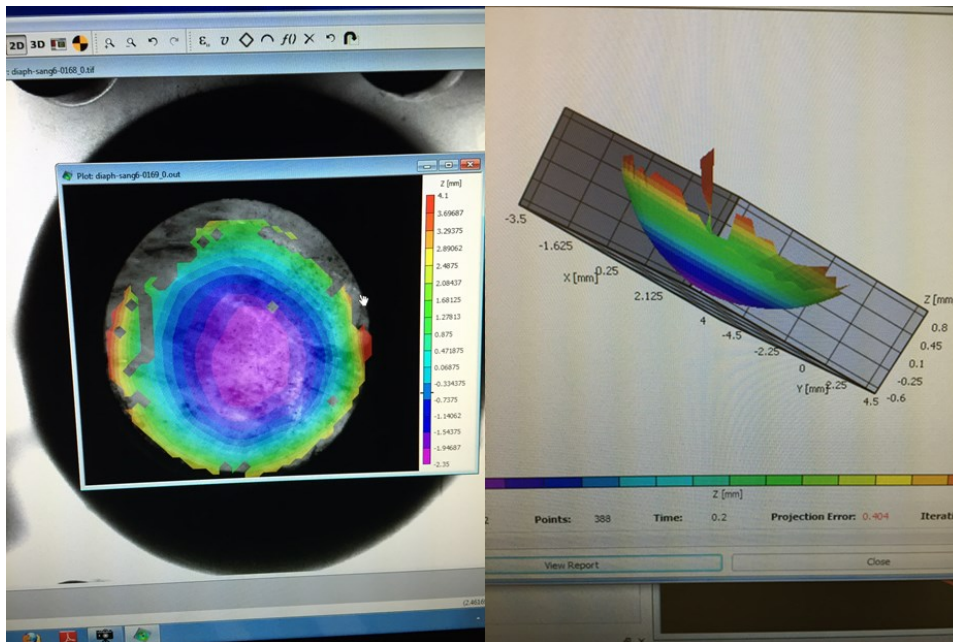


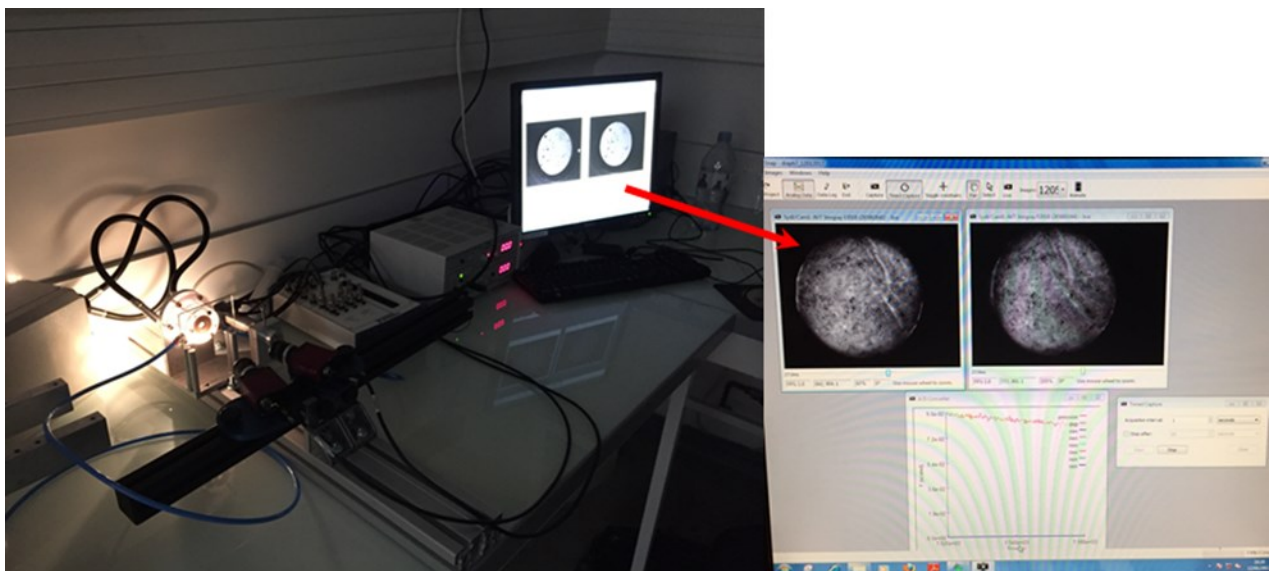
Figure 4.10 : Exemple d'un échantillon moucheté (rouille mélangée à du graphite) maintenu dans la chambre de mise sous pression.



Figures 4.11 : Test de gonflement à l'eau avec rétroéclairage (à travers le plexyglass) et les deux caméras en face permettant l'acquisition d'images et reliées au logiciel Vic Snap.



Figures 4.12 : Analyse d'image avec le logiciel Vic3D : vue en 3D avec gradient de couleurs traduisant les courbes de niveaux d'altitude de l'échantillon soumis au test de gonflement.



Figures 4.13 : Système de stéréo-corrélation d'images : les deux caméras permettent de construire une image en 3D.

IV) 1) d) 2. Résultats

Nous avons actuellement testé une dizaine d'éprouvettes différentes prélevées sur le même diaphragme de porc (coupole droite ou gauche, zone antérieure, centrale ou postérieure). La **Figure 4.14** montre le résultat de test de gonflement de l'éprouvette n°3. On observe une certaine anisotropie dans la déformation de l'éprouvette.

Les premiers résultats obtenus montrent tantôt un caractère isotrope, tantôt anisotrope, selon la localisation de l'échantillon prélevé. Ces résultats sont à compléter en tenant compte de la partie du tendon testé, de l'orientation de l'éprouvette, mais aussi de l'orientation des fibres tendineuses.

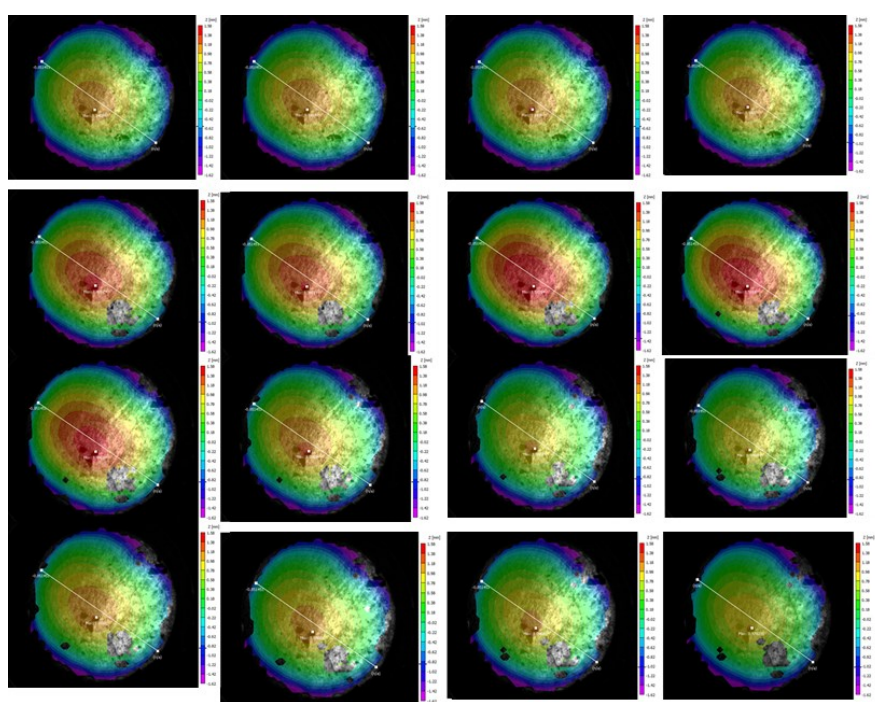


Figure 4.14 : Exemple de synchronisation des mesures de pression et de déplacement suivant l'axe Z (éprouvette n°3).

IV) 1) d) 3. Perspectives

Nous avons entrepris de compléter ces premiers résultats en réalisant des tests de gonflement en fonction de l'orientation des fibres tendineuses⁸⁸, donc de reconstruire une cartographie indiquant les niveaux d'anisotropie en fonction de la zone de prélèvement.

En parallèle, nous souhaitons identifier les paramètres d'une loi de comportement hyperélastique pour tissus mous (type Néo-Hookéen, Yeoh, Mooney-Rivlin).⁸⁹ Pour cela nous ambitionnons de mettre au point une méthode numérique (éléments finis, méthodes inverses) permettant, à partir d'essais de traction et de gonflement, d'identifier les paramètres de la loi de comportement. La validation de la méthode se fera sur un matériau isotrope modèle connu (type feuille de silicone), puis sera élargie aux matériaux hyperélastiques anisotropes (tissu tendineux). On pourra ensuite, en utilisant la même méthode identifier les paramètres mécaniques des nouveaux biomatériaux, et grâce à cela, aider aux choix des prototypes.

IV) 2) Développement de nouveaux biomatériaux pour le traitement de la HDC

Afin de trouver des solutions au problème biomécanique des récidives herniaires dans la HDC, nous nous sommes intéressés au développement de nouveaux biomatériaux, plus étirables. Nous nous sommes ainsi rapprochés de l'équipe du Laboratoire de Physique et Mécanique Textiles (LPMT) de l'École Nationale Supérieure d'Ingénieur Sud Alsace (ENSISA) à Mulhouse, qui dispose des outils et des savoir-faire en matière d'électrofilage.

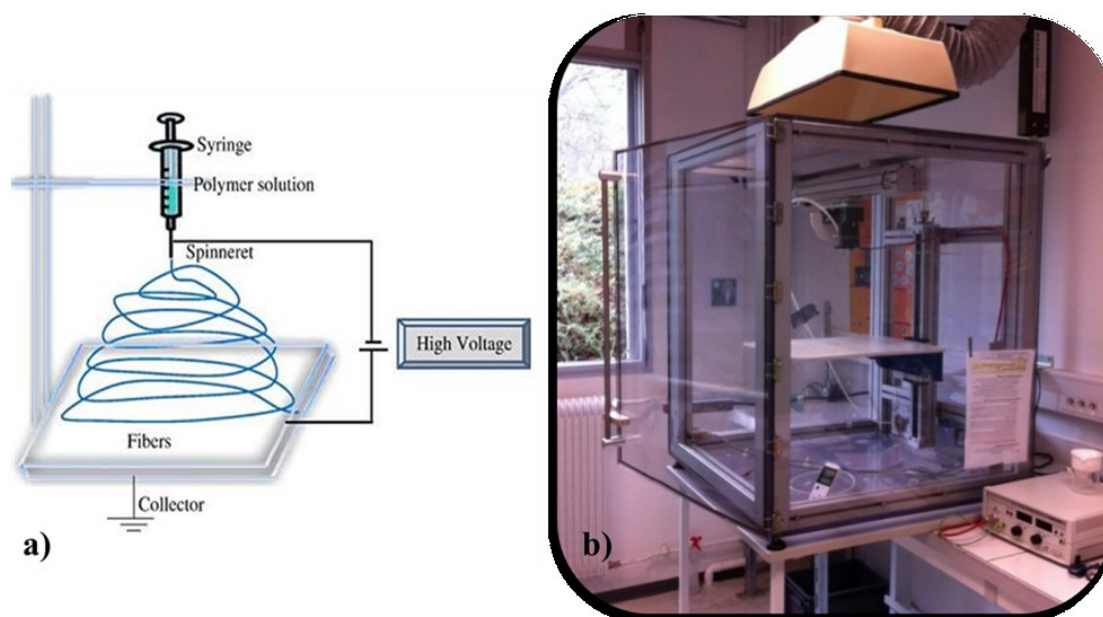
L'objectif est de produire par électrofilage une membrane double-face (implant diaphragmatique) capable de remplacer un diaphragme incomplet et de restaurer ses fonctions biomécaniques. Ce nouveau produit doit être plus étirable que les prothèses en ePTFE utilisées actuellement pour se déformer sur le long terme. Pour fixer les objectifs à atteindre en termes de propriétés mécaniques, nous avons entrepris d'étudier les caractéristiques mécaniques de diaphragmes de porc et de membranes de ePTFE soumis à une traction uni-axiale.

L'ensemble du consortium ayant participé à ce processus inclut l'équipe du LPMT de Mulhouse (thèse de Doctorat d'Elham Mohsenzade), du Laboratoire ICube, Département de mécanique MMB à Strasbourg et du LMGC de Montpellier.

IV) 2) a) Technique d'électrofilage (electrospinning)

L'électrofilage (traduction du terme « electrospinning ») permet de fabriquer des membranes non tissées à partir de polymères. Le diamètre des fils varie entre quelques nanomètres et quelques micromètres.⁹⁰ Il est possible d'obtenir toute sorte de géométries de membranes pour des applications très variées : textile, biomédical, cosmétique, énergie ou encore agroalimentaire.

Le principe de l'électrofilage consiste à injecter une solution de polymère qui sera soumise à un champ électrique de l'ordre du kilovolt (**Figure 4.15a**). Le dispositif comporte un générateur à haute tension de courant continu, une pompe, une seringue équipée d'une aiguille en métal et un collecteur relié à la terre. La technique d'électrofilage permet de mettre en forme le polymère qui est éjecté sous la forme de filaments continus qui vont se déposer de façon aléatoire à la surface d'un support (collecteur ou cible), pour former un matériau non tissé. Cette formation de nanofibres est basée sur l'étirement uni-axial d'une solution viscoélastique.⁹⁰ Deux techniques d'électrofilage sont disponibles au LPMT : le Nanospider™ qui est un dispositif permettant la production industrielle de nanofibres et une enceinte d'électrofilage auto-assemblée qui a été utilisée pour nos travaux (**Figure 4.15b**).⁹¹



Figures 4.15 : a) Schéma de principe d'un dispositif d'électrofilage : un champ électrique est appliqué à un polymère en solution dans une seringue, qui va être éjecté sous la forme de filament continu collecté de façon aléatoire sur la cible (collector) b) Appareil d'électrofilage du LPMT.⁹¹

La technique de l'électrofilage présente divers avantages⁷⁰ :

- la simplicité du procédé et un faible coût,
- la diversité des polymères utilisables en solution,
- la possibilité de produire des nanofibres (50-1000 nm),
- un rapport surface/volume élevé,
- des surfaces et structures poreuses tridimensionnelles très flexibles (proches des matrices extracellulaires naturelles),
- la possibilité de modifier un certain nombre de paramètres afin de modifier les propriétés mécaniques (concentration, voltage, durée d'électrofilage, etc.).

La technique d'électrofilage permet d'obtenir des architectures fibrillaires tridimensionnelles. 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, etc.) et l'ingénierie tissulaire. On considère que ces architectures permettent l'organisation, la prolifération et la différenciation cellulaire nécessaires 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.

IV) 2) b) Description des premiers prototypes

IV) 2) b) 1. Utilisation du polyamide-6

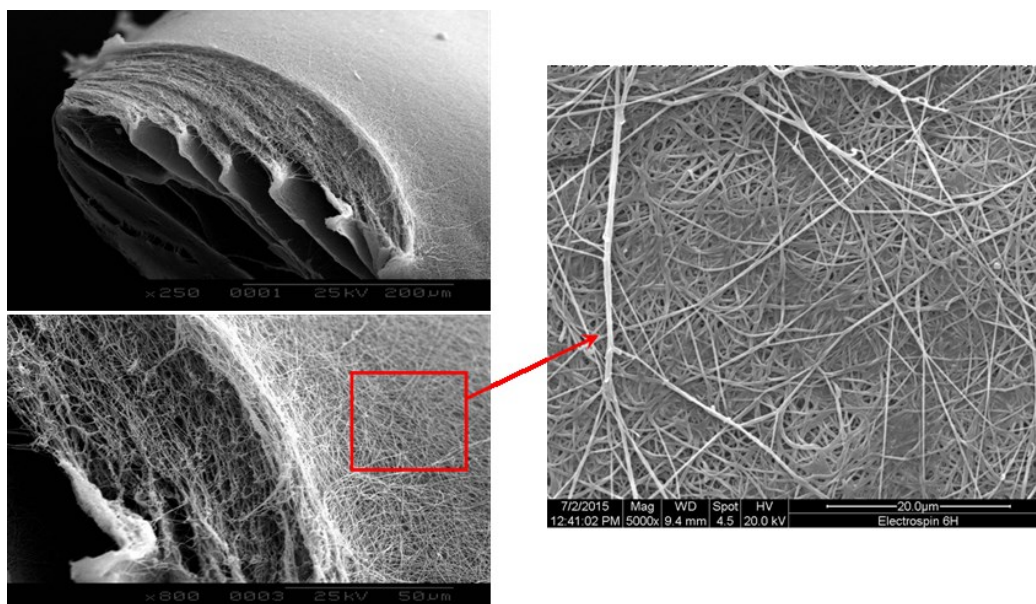
Initialement, le choix du polymère s'est porté sur le polyamide-6 ou polycaprolactane (PA-6) en raison de sa biocompatibilité connue et de l'expérience en électrofilage du PA-6 au LPMT. Les

conditions optimales d'électrofilage pour le PA-6 sont résumées dans le **Tableau IV**.⁹¹ Le PA-6 est dissout dans l'acide formique pour obtenir la solution à électrofiler.

Débit de seringue (mL/h)	Taille de l'aiguille (mm x mm)	Concentration (%)	Distance aiguille- cible (cm)	Voltage (kV)	Température (°C)	Humidité (%)
0,1	0,4 x 19	20	15	30	22	35

Tableau IV : Conditions d'électrofilage définies pour le PA-6.⁹¹

Nous obtenons ainsi, après 6 heures d'électrofilage, des membranes poreuses constituées de multicouches de nanofibres orientées aléatoirement (**Figures 4.16**). La structure en plusieurs couches est due aux changements de conductivité du collecteur avec le temps.



Figures 4.16 : Micrographies de MEB d’une membrane résultant de l’électrofilage de PA-6 (durée 6 heures) (figure haut – gauche). Noter la structure en plusieurs couches (figure bas – gauche).

L’agrandissement de la figure de droite montre la disposition aléatoire des nanofibres.

Nous avons réalisé des essais de traction uni-axiale sur ces membranes de PA-6 électrofilées selon le protocole décrit précédemment et dans les mêmes conditions expérimentales (humidité et température) que les diaphragmes de porc. Les échantillons testés correspondent à des temps de filage de 30 minutes (PA-01) et 60 minutes (PA-02).

Quelques courbes de contrainte/déformation de ces tests sont présentées dans la **Figure 4.17**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau V**, avec dans la dernière colonne les résultats obtenus sur le diaphragme de porc : la durée d’électrofilage ne semble pas influencer les propriétés mécaniques des membranes de PA-6 sauf pour le module de Young. Ces membranes ont également un module de Young plus élevé que le diaphragme de porc.

	PA-01	PA-02	Diaphragme porc
Contrainte rationnelle maximale moyenne en MPa (écart-type en %)	5,7 ($\pm 3,0$)	5,3 ($\pm 1,8$)	4,6 ($\pm 1,2$)
Déformation ingénieure maximale moyenne en % (écart-type en %)	25,2 ($\pm 1,9$)	30,4 ($\pm 10,9$)	38,3 ($\pm 12,9$)
E en MPa (écart-type en %)	39,5 ($\pm 18,5$)	25,4 ($\pm 10,5$)	13,7 ($\pm 4,6$)

Tableau V : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du PA-6 électrofilé (PA-01 : 30 min ; PA-02 : 60 min).

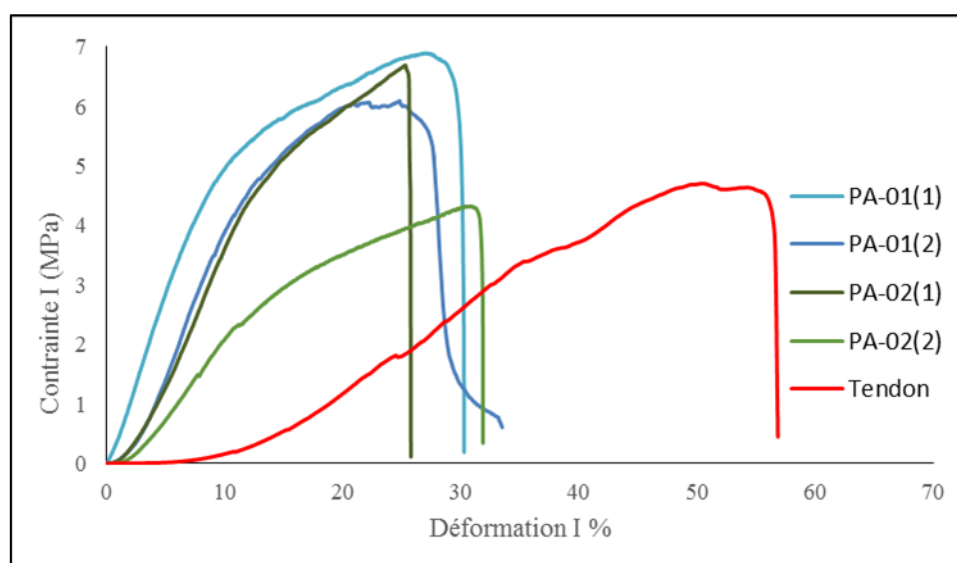


Figure 4.17 : Courbes de contrainte/déformation ingénieure des membranes de PA-6 pour différentes durées d'électrofilage (PA-01 : 30 min, en bleu ; PA-02 : 60 min, en vert) comparées à la courbe obtenue pour le tendon (en rouge).

Ces premiers résultats n'annoncent cependant pas une avancée, en termes de propriétés mécaniques (déformabilité), par rapport aux tests réalisés sur le diaphragme de porc et le ePTFE. De ce fait, nous nous sommes intéressés à d'autres polymères, dont le polyuréthane (PU).

IV) 2) b) 2. Utilisation du polyuréthane

Monocouche de polyuréthane électrofilée

Le PU est un polymère biocompatible présentant des propriétés mécaniques (élastiques) intéressantes.⁹² Notre but étant d'optimiser les conditions de production des nanofibres de PU par la méthode d'électrofilage, nous avons réalisé différents essais en modifiant les paramètres (voltage, distance aiguille-cible, durée d'électrofilage). Les conditions d'électrofilage du PU retenues sont décrites dans le **Tableau VI**.⁹³ Finalement, il a été possible de produire des nanofibres de PU homogènes avec des diamètres (entre 800 et 1200 nm) et des épaisseurs variables (**Figure 4.18**).

Débit de seringue (mL/h)	Taille de l'aiguille (mm x mm)	Concentration (%)	Distance aiguille- cible (cm)	Voltage (kV)	Température (°C)	Humidité (%)
0,5	0,6 x 30	11	19-23	10-12	22	35

Tableau VI : Conditions d'électrofilage retenues pour le PU.

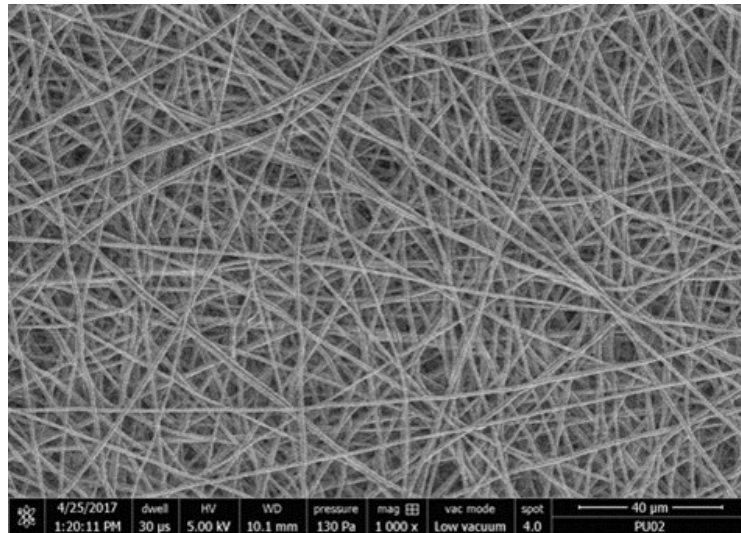


Figure 4.18 : Orientation aléatoire des nanofibres de PU (MEB, Low vacuum).

Nous avons réalisé des essais de traction uni-axiale sur ces membranes de PU électrofilées selon le protocole décrit précédemment et dans les mêmes conditions expérimentales (humidité et température) que les diaphragmes de porc. Les échantillons testés ont des temps de filage de 30 minutes (PU-01) et 60 minutes (PU-02).

Quelques courbes de contrainte/déformation de ces tests sont présentées dans la **Figure 4.19**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau VII** : il apparaît que l'augmentation du temps d'électrofilage (PU-02) diminue la résistance mécanique et les capacités de déformabilité mais pas le module de Young (raideurs équivalentes). Nous pouvons déjà en déduire que le PU présente des propriétés mécaniques plus intéressantes (plus grande étirabilité) pour les temps d'électrofilage courts (PU-01) et aussi plus intéressantes que le diaphragme de porc.

	PU-01	PU-02	Diaphragme porc
Contrainte rationnelle maximale moyenne en MPa (écart-type en %)	37,0 ($\pm 12,7$)	20,0 ($\pm 4,3$)	4,6 ($\pm 1,2$)
Déformation ingénieure maximale moyenne en % (écart-type en %)	703,0 ($\pm 113,9$)	455,2 ($\pm 55,8$)	38,3 ($\pm 12,9$)
E en MPa (écart-type en %)	2,1 ($\pm 0,3$)	1,8 ($\pm 0,3$)	13,7 ($\pm 4,6$)

Tableau VII : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du PU électrofilé (PU-01 : 30 min ; PU-02 : 60 min).

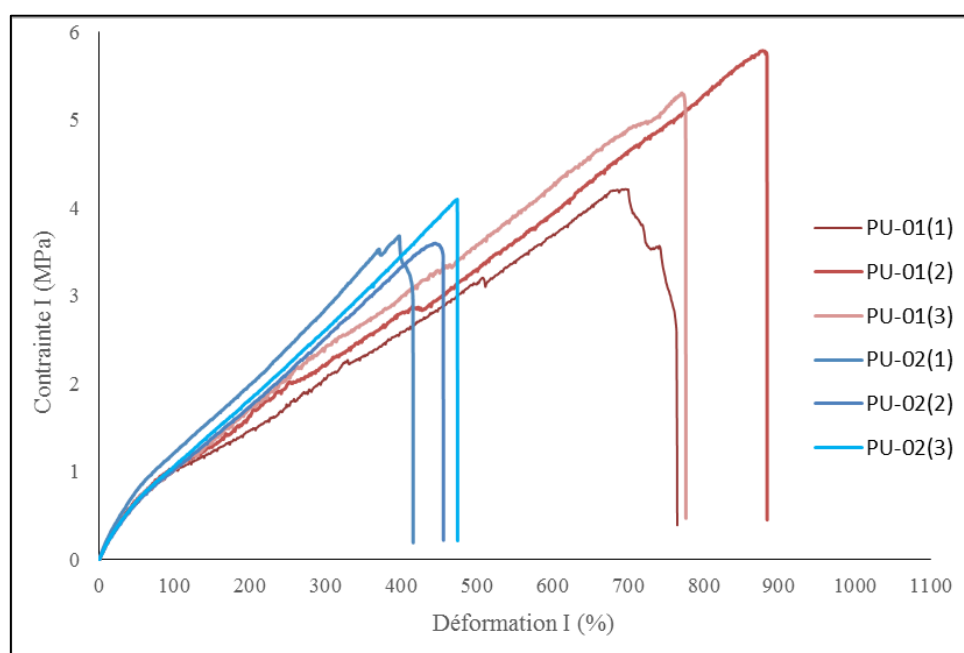


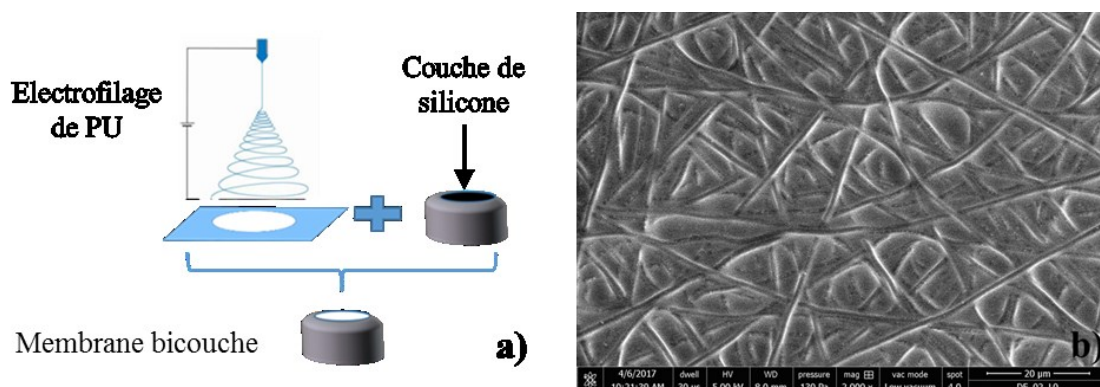
Figure 4.19 : Courbes de contrainte/déformation ingénieure du PU en fonction du temps d'électrofilage (PU-01 : rouge ; PU-02 : bleu).

Membrane électrofilée bicouche

Notre ambition est de créer un implant avec deux faces distinctes. L'implant bicouche, que nous avons mis au point, et proposons, est composé de nanofibres de PU, d'un côté, et de FDA-RTV silicone, de l'autre côté. En effet, le silicone est doté d'une grande élasticité mais d'une faible résistance à la traction, ce qui peut être compensé par la résistance plus importante du PU.⁹⁴

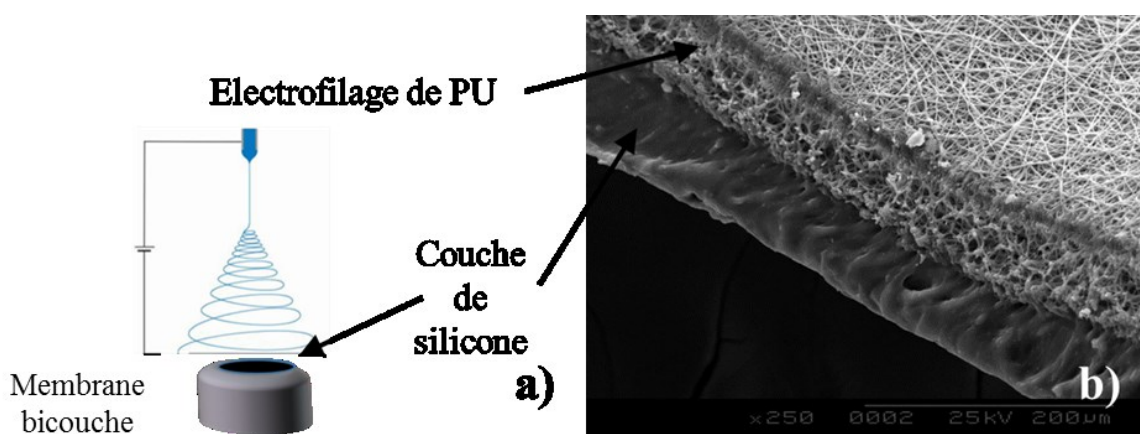
Ce genre de membrane bi-face peut être obtenu selon deux voies⁹⁴, à partir des paramètres d'électrofilage du PU définis précédemment (**Tableau VI**).

La première méthode de fabrication consiste à produire séparément les deux couches de la membrane et à les assembler ensuite. Le FDA-RTV silicone se présente sous la forme d'un gel qui polymérise progressivement à température ambiante pour former un film élastique qui constituera la surface lisse (pour le côté abdominal) de l'implant biface. L'assemblage des deux couches s'opère spontanément pendant la phase de polymérisation du gel de silicone (**Figure 4.20a**). Le silicone va remonter par capillarité dans les pores existants de la couche de nanofibres de PU. Nous avons remarqué que, plus la couche de silicone est épaisse, plus l'imprégnation de la couche électrofilée sera importante ; ce qui diminue considérablement la porosité (recherchée) de la partie fibrillaire (**Figure 4.20b**). Par conséquent, cette approche nécessite encore des mises au point.



Figures 4.20 : a) Première méthode de fabrication d'une membrane bicouche ; b) Vue de la face fibrillaire du matériau composite montrant les nanofibres de PU « noyées » dans la couche de silicone (MEB, Low vacuum).

La deuxième méthode de fabrication (**Figures 4.21**) consiste à filer directement les nanofibres sur une couche de silicone en phase de polymérisation dans une enceinte à 37°C. Cette couche de silicone se substitue donc au collecteur lors de l'électrofilage. La particularité de cette approche réside dans le fait qu'elle va produire une couche fibrillaire posée sur un substrat en silicone (**Figure 4.21b**), ce qui pourrait laisser supposer une adhérence limitée entre des deux couches distinctes.⁹⁴



Figures 4.21 : a) Deuxième méthode d'élaboration d'une membrane bicouche ; b) Vue de la tranche de section de cet implant montrant les deux faces bien distinctes (MEB).

Nous avons réalisé des essais de traction uni-axiale sur ces membranes bicouche de PU électrofilé directement sur le silicone (ES-DF), obtenues par la deuxième méthode de fabrication. Les échantillons testés avaient des temps de filage de 30 minutes (ES-DF-01) et 60 minutes (ES-DF-02).

Quelques courbes de contrainte/déformation ingénieure de ces tests sont présentées dans la **Figure 4.22**. Les résultats sont donnés dans le **Tableau VIII** : Il apparaît que l'augmentation du temps d'électrofilage fait diminuer la résistance mécanique et la déformation maximale, mais pas le module de Young (raideur équivalente). Nous pouvons en déduire que le ES-DF est un produit mieux adapté à

la problématique étudiée (HDC), en termes de propriétés mécaniques, lorsque le temps d'électrofilage est plus court (plus ductile, plus grande résistance mécanique).

	ES-DF-01	ES-DF-02	Diaphragme porc
Contrainte rationnelle maximale moyenne en MPa (écart-type en %)	23,9 ($\pm 3,5$)	10,2 ($\pm 2,4$)	4,6 ($\pm 1,2$)
Déformation ingénieure maximale moyenne en % (écart-type en %)	599,3 ($\pm 10,5$)	394,3 ($\pm 51,4$)	38,3 ($\pm 12,9$)
E en MPa (écart-type en %)	1,8 ($\pm 0,2$)	1,7 ($\pm 0,3$)	13,7 ($\pm 4,6$)

Tableau VIII : Résultats comparatifs des essais de traction uni-axiale du ES-DF (ES-DF-01 : 30 min ; ES-DF-02 : 60 min).

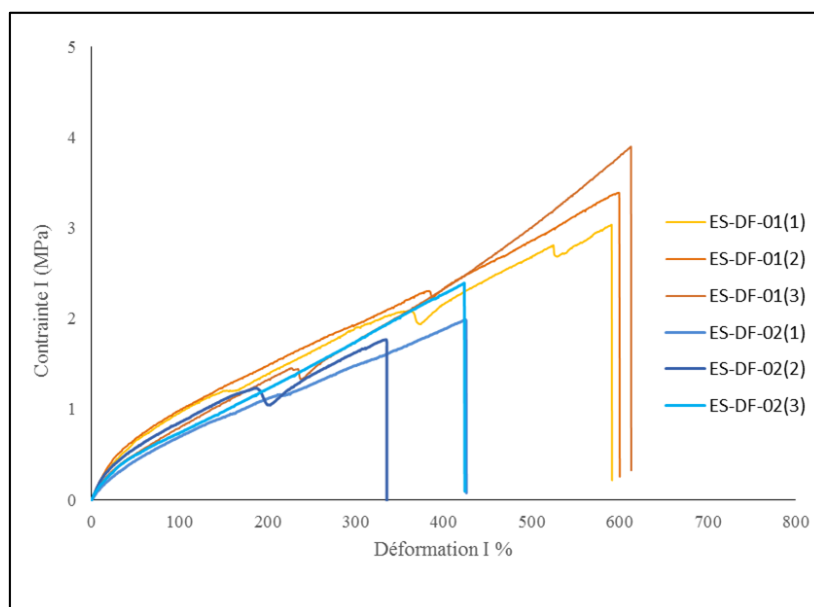


Figure 4.22 : Courbes de contrainte/déformation ingénieure du ES-DF en fonction de la durée d'électrofilage (ES-DF-01 : 30 min, tons orangés ; ES-DF-02 : 60 min, tons bleus).

IV) 2) c) Comparaison des premiers prototypes réalisés et perspectives

Afin de comparer l'ensemble des tests de traction réalisés sur les différents échantillons, nous avons sélectionné une courbe caractéristique pour chacun des matériaux (ePTFE, PU, ES-DF) que nous avons comparée au résultat obtenu pour le centre tendineux du diaphragme de porc. L'ensemble des courbes est représenté dans la **Figure 4.23** : Il apparaît que le matériau ES-DF est le plus déformable (étirable) ; la résistance à la traction est moins importante que celle du ePTFE, mais est semblable aux valeurs obtenues pour le tissu biologique. En effet, ce nouveau biomatériau ne doit pas avoir de résistance mécanique hors norme (comme le ePTFE). D'un point de vue mécanique, à contrainte équivalente, nos membranes ES-DF se déforment plus, donc, pourront suivre la croissance physiologique.

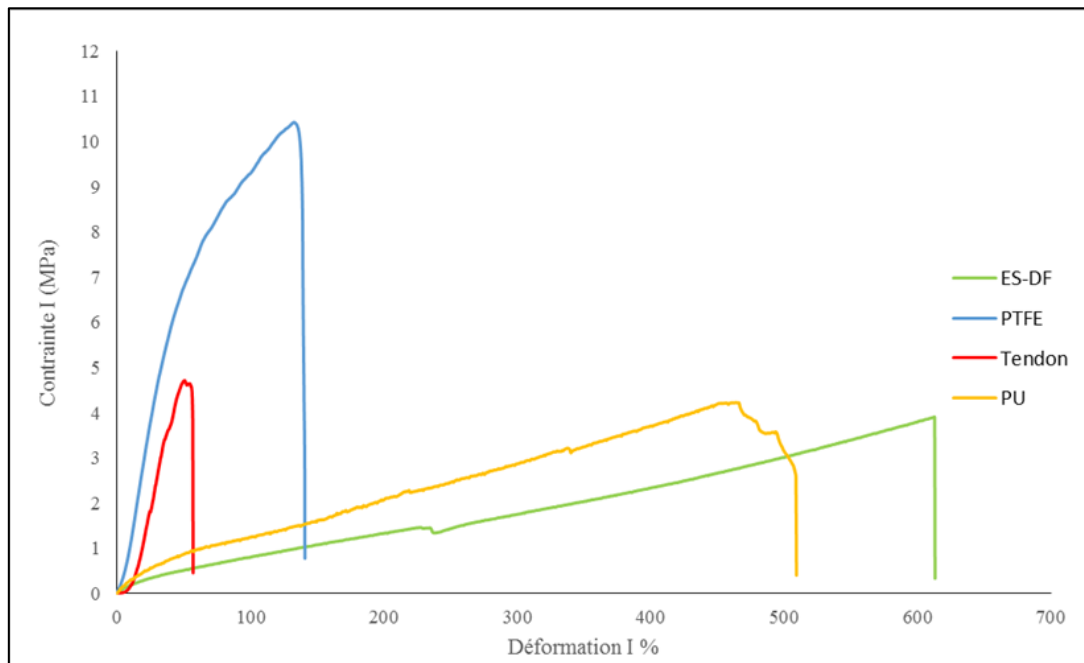


Figure 4.23 : Comparaison des courbes de contrainte/déformation ingénieur pour le centre tendineux du diaphragme (rouge), le ePTFE (bleu), le PU (jaune) et le ES-DF (vert).

Nous avons également réalisé des observations par microscopie électronique à balayage sur le ePTFE, le PA, le PU et le ES-DF soumis à une traction uni-axiale progressive. Pour ce faire, nous avons fabriqué une platine d'étirement uni-axial qui peut être placée dans le MEB (**Figure 4.24**). Dans le MEB, la longueur initiale des échantillons est limitée à 7 mm pour obtenir une déformation finale de 100%, ce qui n'est pas conforme à la norme employée sur le banc de traction. Néanmoins, ces observations permettent de comparer les comportements structuraux des prototypes sous étirement. Les visualisations microscopiques des éprouvettes sous étirement doivent se faire dans le mode « Low vacuum » (vide partiel) qui permet de s'affranchir de l'étape de métallisation.

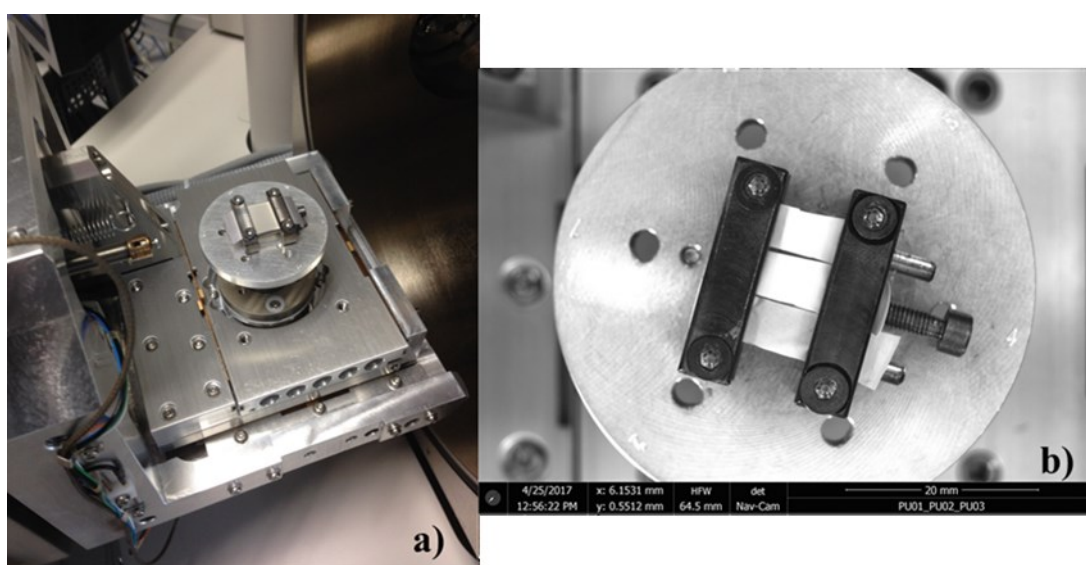


Figure 4.24 : a) Dispositif d'étirement uni-axial placé dans le MEB ; b) Trois échantillons de PU montés entre les mors parallèles (longueur initiale : 7 mm ; largeur : 5 mm).

Les analyses microscopiques ont révélé que les échantillons de PA cassent entre 30 et 50 % de déformation. La **Figure 4.25** illustre les observations réalisées pour le ePTFE face rugueuse, le PU-01 et ES-DF-01 soumis à des tractions 50 et 100 %. Le ePTFE montre des microfissures dès 75 % d'étirement avec une elongation des nœuds dans le sens de la traction et un allongement des fibrilles.⁵¹ L'implant en PU et l'implant bicouche ES-DF réagissent très bien à l'étirement. On observe un

allongement des nanofibres dans le sens de la traction avec un effet de flambement pour les nanofibres orientées perpendiculairement à la sollicitation mécanique.

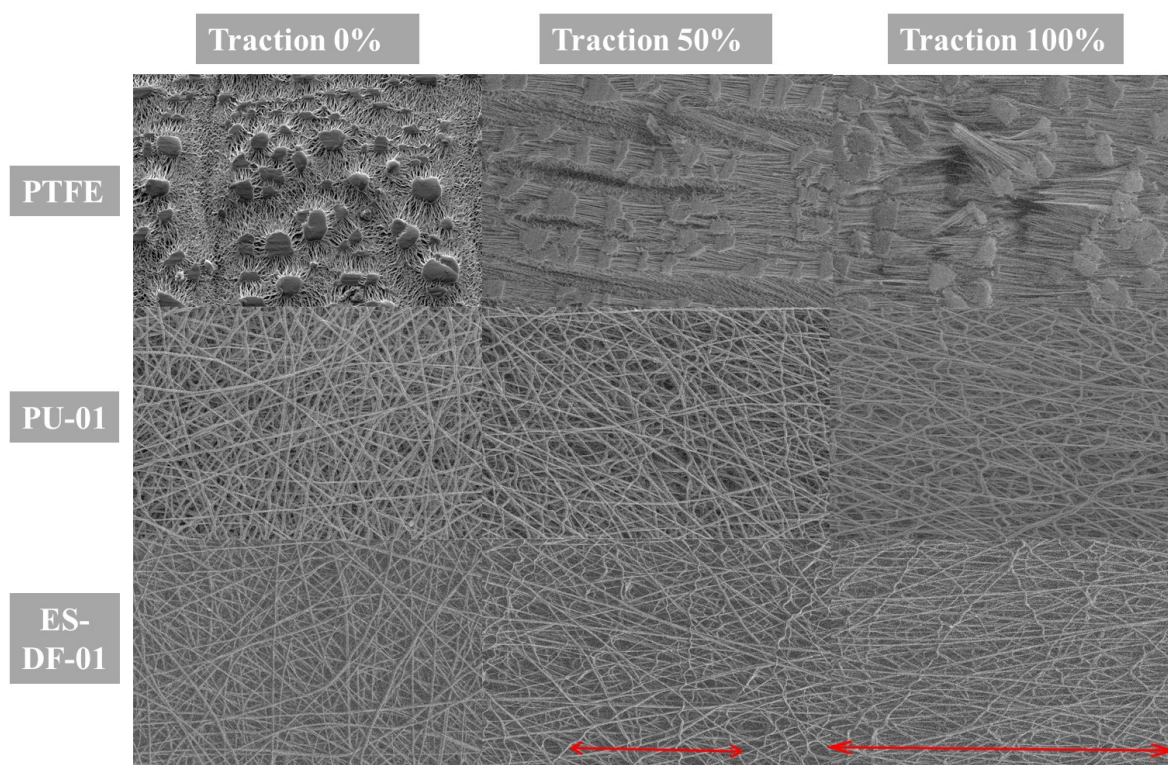


Figure 4.25 : Comparaison en MEB du ePTFE, du PU et du ES-DF soumis à des étirements de 50 et 100% (MEB, 1000x, Low vacuum).

Les premiers résultats obtenus avec les membranes composite PU électrofilé sur silicone, semblent donc prometteurs puisqu'ils répondent au cahier des charges établi, en termes d'étirabilité et de tenue mécanique. De plus, le PU est très intéressant puisqu'il est de grade médical. Il n'empêche que les évaluations biologiques de membranes de PU obtenues par électrofilage qui sont décrites dans la littérature semblent satisfaisantes et mentionnent une importante infiltration cellulaire.^{70, 93} Il semble toutefois pertinent d'évaluer la réponse cellulaire en modulant, la taille des fibres, la porosité et l'épaisseur totale de la membrane. Des travaux d'évaluation biologique des caractéristiques compositionnelles et structurales sont en cours à l'Inserm UMR_S 1121 dans le but d'optimiser des

prototypes qui favorisent l'intégration tissulaire et permettent de restaurer la fonction du diaphragme lésé.

Le questionnement principal qui subsiste au sujet de la technique utilisée (PU électrofilé sur silicone) concerne le niveau d'adhérence entre la couche électrofilée et le substrat en silicone.⁹⁴ En effet, l'adhérence à l'interface est déterminante pour les propriétés mécaniques du nouveau matériau composite.

Le principal avantage de ce nouveau biomatériau est sa capacité à s'adapter aux modifications dimensionnelles du diaphragme, inhérentes à la croissance physiologique accompagnant le développement physique de l'enfant. Premièrement, la nouvelle membrane élastique offre une étirabilité supérieure au produit implantaire conventionnel (ePTFE) majoritairement utilisé actuellement. Les propriétés mécaniques accrues de la nouvelle membrane prothétique ont pour but de réduire les échecs implantaires, le nombre de récidives herniaires et, par conséquent, le taux de morbidité de la HDC. D'autre part, la technologie de fabrication employée permet de produire un biomatériau bi-couche qui répond aux contraintes chirurgicales. La membrane nouvellement développée est prévue pour empêcher les adhérences sur le versant abdominal et, grâce à la modulation de l'architecture du côté fibrillaire, pour guider l'intégration tissulaire de l'implant.

L'étude de brevetabilité du produit innovant, présenté dans ce chapitre, menée par la SATT CONECTUS ALSACE, a été concluante : l'invention remplit effectivement les critères de nouveauté (biomatériau composite de PU sur silicone), émane d'une activité inventive (mise au point d'un matériau biface étirable) et vise des applications industrielles (le produit innovant répond d'ores et déjà à un besoin dans le cadre des prothèses pariétales). Une Déclaration d'Invention a été déposée auprès de la SATT CONECTUS ALSACE.

Conclusions générales

Conclusions générales

Malgré les progrès réalisés, en termes de diagnostic, de réanimation et de chirurgie, le traitement par remplacement prothétique des HDC à large défaut reste source de récurrence. L'augmentation de la surface du diaphragme, due à la croissance de l'enfant, joue un rôle primordial dans la genèse des échecs implantaires. En effet, à ce jour, il existe une inadéquation entre la croissance biologique du diaphragme et les capacités d'adaptation du biomatériau le plus utilisé pour combler l'orifice pathologique.

Une revue de la littérature montre clairement que l'implant parfait n'est toujours pas disponible. Une telle prothèse devrait être biocompatible, résistante à la traction, assez souple pour suivre les mouvements physiologiques de la ventilation et de la mobilité de l'enfant, empêcher les adhérences sur le versant abdominal mais, par contre, favoriser l'intégration tissulaire au niveau des attaches périphériques et, idéalement, conduire au développement d'un tissu biologique néoformé sur le versant thoracique. Le but ultime, bien entendu, serait de pouvoir induire une réparation biologique capable de restaurer la fonction du diaphragme malformé.

Le ePTFE est actuellement le biomatériau le plus utilisé pour le remplacement diaphragmatique dans la HDC. Il présente des propriétés mécaniques indéniables, comme une grande résistance à la traction. À n'en pas douter, d'un point de vue « réparation » d'un diaphragme incomplet, ce biomatériau permet de combler le défaut.

Néanmoins les capacités d'intégration tissulaire du ePTFE sont modérées et dépendent fortement de la micro-texture de sa surface. Or, un certain nombre d'échecs implantaires rencontrés dans la HDC sont probablement liés à une infiltration cellulaire limitée dans l'implant. Cette limitation est responsable d'une incorporation insuffisante du biomatériau dans les tissus adjacents utilisés pour y attacher la prothèse.

Un deuxième constat pointe du doigt qu'un certain nombre de récurrences sont indiscutablement imputables à la faible étirabilité du ePTFE. Bien que le produit en question présente des propriétés

élastiques qui, à première vue, pourraient paraître intéressantes pour le traitement de la HDC, il faut souligner que ces valeurs ne s'appliquent pas dans le contexte *in vivo* considéré, où les attaches se font sur des tissus biologiques via des fils de suture. En effet, le suivi clinique des patients traités montre que soit les fixations sur les tissus périphériques cèdent et conduisent à un « lâchage » de la prothèse, soit la fixation résiste et mène à des déformations squelettiques.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons entrepris, de déterminer le taux de croissance du diaphragme biologique sur la période allant du plus jeune âge (moment de la pose de la prothèse) à l'adolescence. La connaissance de ce paramètre crucial est essentielle pour l'établissement d'un cahier des charges pour un biomatériau optimal. Sur la base de l'analyse de documents radiologiques issus d'enfants suivis pour d'autres pathologies, nous avons pu mettre en évidence que la surface d'un diaphragme biologique grandit entre quatre et cinq fois sur la période considérée. Pour un produit implantaire employé dans l'indication de la HDC, le respect de ce paramètre d'étirabilité représente donc une condition *sine qua non* pour restaurer, sur le long terme, la fonction du diaphragme malformé.

Comme la conception d'un biomatériau répondant à ces derniers critères mécaniques demandait un certain temps, nous nous sommes penchés sur des moyens de fonctionnalisation du matériau couramment employé actuellement : le ePTFE. Cette approche permettrait, d'ores et déjà, d'envisager la possibilité de guider la réponse de l'hôte à la surface du biomatériau majoritairement utilisé par les chirurgiens. Nous avons opté pour l'utilisation de la polydopamine pour modifier le ePTFE. Nos travaux montrent que la simple immersion du matériau dans une solution de polydopamine modifie ses propriétés surfaciques. Le ePTFE ainsi traité avec de la polydopamine devient plus hydrophile et favorise la colonisation cellulaire. Comme la solution optimale consiste à implanter un matériau biface (un côté inhibant, l'autre favorisant les développements cellulaires), nous avons mis en œuvre une méthode de fonctionnalisation d'une seule face de la membrane en ePTFE. Cette technique de revêtement avec un film de polydopamine constitue une amélioration probante du matériau brut.

La dernière partie de ce travail de thèse s'intéresse plus spécifiquement aux aspects biomécaniques liés au traitement de la HDC à large défaut et ouvre la voie sur de nouveaux biomatériaux. Pour préciser et quantifier les objectifs à atteindre, en termes de biomécanique, nous avons caractérisé (contrainte/déformation maximale) des diaphragmes de porc (modélisation comportementale du tissu humain) par tractions uni-axiales et sollicitations en gonflement. Ensuite, nous avons entrepris de synthétiser des membranes répondant aux critères établis. Nos développements ont abouti à la mise au point d'une membrane bicouche : une couche de PU électrofilé sur un substrat de FDA-RTV silicone. Le biomatériau nouvellement développé est doté de propriétés mécaniques anisotropes dépendant du diamètre des fibres et de leur organisation spatiale. Cette architecture biocompatible offre une résistance mécanique et une élasticité conformes aux exigences d'implantation. L'optimisation de la couche fibrillaire permettra de guider l'intégration tissulaire du côté thoracique et la couche opposée, en silicone, est censée empêcher les adhérences entre la prothèse et les intestins. Le renforcement des sites de fixation (sutures) et les investigations biologiques (cultures cellulaires) de ce nouveau produit sont en cours de réalisation. La modification chimique du biomatériau est aussi envisagée.

Le biomatériau bicouche nouvellement développé, qui offre des perspectives prometteuses dans le domaine des prothèses pariétales, fait actuellement l'objet d'une Déclaration d'Invention.

Références bibliographiques

1. The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Defect size determines survival in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2007;120:651-657.
2. Barrière F, Michel F, Loundou AD, Fouquet V, Kermorvant E, Blanc S, Carricaburu E, Desrumaux A, Pidoux O, Arnaud A, Lavrand L, Berte N, Blanc T, Levard G, Rayet I, Samperiz S, Schneider A, Marcoux MO, Winer N, Chaussy Y, Datin-Dorriere V, Ballouhey Q, Binet A, Muszynski C, Breaud J, Garenne A, Storme L, Boubnova J. One-year outcome for congenital diaphragmatic hernia: results from the French National Register. *Journal of Pediatrics ; en cours de révision*.
3. Haroon J, Chamberlain RS. An evidence-based review of the current treatment of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Pediatr* 2013;52:115-124.
4. Harting MT, Lally KP. The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry update. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19:370-375.
5. Garne E, Haeusler M, Barisic I, Gjergja R, Stoll C, Clementi M. Congenital diaphragmatic hernia: evaluation of prenatal diagnosis in 20 European regions. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:329-333.
6. Sananès N, Ruano R, Weingertner AS, Regnard P, Salmon Y, Kohler A, Miry C, Mager C, Guerra F, Schneider A, Becmeur F, Leroy J, Dimarcq JL, Debry C, Favre R. Experimental fetal endoscopic tracheal occlusion in rhesus and cynomolgus monkeys : nonhuman primate models. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;28:1822-1827.
7. Danzer E, Hedrick HL. Controversies in the management of severe congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19:376-384.
8. Zani A, Zani-Ruttenstock E, Pierro A. Advances in the surgical approach to congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19:364-369.
9. Moss RL, Chen CM, Harrison MR. Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia : a long-term follow-up study. *J Pediatr Surg* 2001;36:152-154.

10. Barbosa RF, Rodrigues J, Correia-Pinto J, Costa-Ferreira A, Cardoso A, Reis JC, Amarante JM. Repair of a large congenital diaphragmatic defect with a reverse latissimus dorsi muscle flap. *Microsurgery* 2008;28:85-88.
11. Masumoto K, Nagata K, Souzaki R, Uesugi T, Takahashi Y, Taguchi T. Effectiveness of diaphragmatic repair using an abdominal muscle flap in patients with recurrent congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2007;42:2007-2011.
12. Barnhart DC, Jacques E, Scaife ER, Yoder BA, Meyers RL, Harman A, Downey EC, Rollins MD. Split abdominal wall muscle flap repair vs. patch repair of large congenital diaphragmatic hernias. *J Pediatr Surg* 2012;47:81-86.
13. Nasr A, Struijs MC, Ein SH, Langer JC, Chiu PPL. Outcomes after muscle flap vs. prosthetic patch repair for large congenital diaphragmatic hernias. *J Pediatr Surg* 2010;45:151-154.
14. Fauza DO. Tissue engineering in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2014;23:135-140.
15. Terui K, Nagata K, Ito M, Yamoto M, Shiraishi M, Taguchi T, Hayakawa M, Okuyama H, Yoshida H, Masumoto K, Kanamori Y, Goishi K, Urushihara N, Kawataki M, Inamura N, Kimura O, Okazaki T, Toyoshima K, Usui N. Surgical approaches for neonatal congenital diaphragmatic hernia : a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Surg Int* 2015;31:891-897.
16. Clark RH, Hardin WD, Hirschl RB, Jaksic T, Lally KP, Langham MR, Wilson JM. Current surgical management of congenital diaphragmatic hernia : a report from the congenital diaphragmatic hernia study group. *J Pediatr Surg* 1998;33:1004-1009.
17. Lequien P. Pronostic à court et long terme des hernies diaphragmatiques congénitales à révélation néonatale. *Rev Med Perinat* 2009;1:42-45.
18. Tracy S, Chen C. Multidisciplinary long-term follow-up of congenital diaphragmatic hernia : a growing trend. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19:385-391.
19. Jancelewicz T, Vu LT, Keller RL, Bratton B, Lee H, Farmer D, Harrison M, Miniati D, Mackenzie T, Hirose S, Nobuhara K. Long-term surgical outcomes in congenital diaphragmatic hernia : observations from a single institution. *J Pediatr Surg* 2010;45:155-160.

20. Brouwer KM, Daamen WF, Hoogenkamp HR, Geutjes PJ, de Blaauw I, Janssen-Kessels W, de Boode W, Versteeg E, Wijnen RM, Feitz WF, Wijnen M, van Kuppevelt TH. Collagen-Vicryl scaffolds for reconstruction of the diaphragm in a large animal model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014;102:756-763.
21. Grethel EJ, Cortes RA, Wagner AJ, Clifton MS, Lee H, Farmer DL, Harrison MR, Keller RL, Nobuhara KK. Prosthetic patches for congenital diaphragmatic hernia repair : Surgisis vs. Gore-Tex. *J Pediatr Surg* 2006;41:29-33.
22. Rowe DH, Stolar CJ. Recurrent diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2003;12:107-109.
23. Al-lede MM, Karpelowsky J, Fitzgerald DA. Recurrent diaphragmatic hernia : modifiable and non-modifiable risk factors. *Pediatr Pulmonol* 2016;51:394-401.
24. Saadé J, Ladjal H, Behzad S, Beuve M, Azencot J (2012). Modélisation biomécanique du diaphragme humain: du CT-4D au modèle du mouvement. In *RFIA 2012 (Reconnaissance des Formes et Intelligence Artificielle)* (pp.978-2).
25. Loff S, Wirth H, Jester I, Hosie S, Wollmann C, Schaible T, Ataman Ö, 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;40:1701-1705.
26. Gasior AC, Peter SD. A review of patch options in the repair of congenital diaphragm defects. *Pediatr Surg Int* 2012;28:327-333.
27. Tsai J, Sulkowski J, Adzick NS, Hedrick HL, Flake AW. Patch repair for congenital diaphragmatic hernia : is it really a problem? *J Pediatr Surg* 2012;47:637-641.
28. Priebe CJ Jr, Wichem WA Jr. Ventral hernia with a skin-covered Silastic sheet for newborn infants with a diaphragmatic hernia. *Surgery* 1977;82:569-572.
29. Valente A, Brereton RJ. Unilateral agenesis of the diaphragm. *J Pediatr Surg* 1987;22:848-850.
30. Riehle KJ, Magnuson DK, Waldhausen JHT. Low recurrence rate after Gore-Tex/Marlex composite patch repair for posterolateral congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2007;42:1841-1844.

31. Romao RLP, Nasr A, Chiu PPL, Langer JC. What is the best prosthetic material for patch repair of congenital diaphragmatic hernia? Comparison and meta-analysis of porcine small intestine submucosa and polytetrafluoroethylene. *J Pediatr Surg* 2012;47:1496-1500.
32. Laituri CA, Garey CL, Valusek PA, Fike FB, Kaye AJ, Ostlie DJ, Snyder CL, St Peter SD. Outcome of congenital diaphragmatic hernia repair depending on patch type. *Eur J Pediatr Surg* 2010;20:363-365.
33. Mitchell IC, Garcia NM, Barber R, Ahmad N, Hicks BA, Fischer AC. Permacol a potential patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair. *J Pediatr Surg* 2008;43:2161-2164.
34. Dalla Vecchia L, Engum S, Kogon B, Jensen E, Davis M, Grosfeld J. Evaluation of small intestine submucosa and acellular dermis as diaphragmatic prostheses. *J Pediatr Surg* 1999;34:167-171.
35. Koot VC, Bergmeijer JH, Molenaar JC. Lyophilized dura patch repair of congenital diaphragmatic hernia : occurrence of relapses. *J Pediatr Surg* 1993;28:667-668.
36. Ramadwar RH, Carachi R, Young DG. Collagen-coated Vicryl mesh is not a suitable material for repair of diaphragmatic defects. *J Pediatr Surg* 1997;32:1708-1710.
37. 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;24:1041-1045.
38. Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, Toshimitsu Y, Okada K, Akimoto N, Ueno Y, Koyama I, Ikada Y. Newly designed bioabsorbable substitute for the treatment of diaphragmatic defects. *Surg Today* 2013;43:1298-1304.
39. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials* 2008;29:2899-2906.
40. Zhao W, Ju YM, Christ G, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Diaphragmatic muscle reconstruction with an aligned electrospun poly(epsilon-caprolactone)/collagen hybrid scaffold. *Biomaterials* 2013;34:8235-8240.

41. Fauza DO, Marler JJ, Koka R, Forse RA, Mayer JE, Vacanti JP. Fetal tissue engineering : diaphragmatic replacement. *J Pediatr Surg* 2001;36:146-151.
42. Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Udagawa T, Jennings RW, Wilson JM, Fauza DO. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg* 2004;39:834-838.
43. Kunisaki SM, Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan DA, Vacanti JP, Wilson JM, Fauza DO. Diaphragmatic repair through fetal tissue engineering : a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast-based constructs. *J Pediatr Surg* 2006;41:34-39.
44. 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;46:57-61.
45. Rehan VK, Laiprasert J, Wallach M, Rubin MW, Rubin LP, McCool FD. Diaphragm dimensions of the healthy preterm infant. *Pediatrics* 2001;108:e91.
46. Rehan VK, McCool FD. Diaphragm dimensions of the healthy term infant. *Acta Paediatr* 2003;92:1062-1067.
47. Kamata S, Usui N, Sawai T, Nose K, Kamiyama M, Fukuzawa M. Radiographic changes in the diaphragm after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008;43:2156-2160.
48. Schneider A, Koob M, Sananes N, Senger B, Hemmerlé J, Becmeur F. Computed tomographic study of the pediatric diaphragmatic growth : application to the treatment of congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 2017;27:177-180.
49. Jørgensen CS, Paaske WP. Physical and mechanical properties of ePTFE stretch vascular grafts determined by time-resolved scanning acoustic microscopy. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998;15:416-422.
50. Matthews BD, Pratt, BL, Pollinger HS, Backus CL, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Assessment of adhesion formation to intra-abdominal polypropylene mesh and polytetrafluoroethylene mesh. *J Surg Res* 2003;114:126-132.

51. Ebnesajjad S. Expanded PTFE applications handbook : Technology, manufacturing and applications. Elsevier, 2017.
52. Bellon JM, Contreras LA, Bujan J, Carrera-San Martin A. Experimental assay of a Dual Mesh PTFE prosthesis (non-porous on one side) in the repair of abdominal wall defects. *Biomaterials* 1996;17:2367-2372.
53. Bellon JM, Contreras LA, Pascual G, Bujan J. Evaluation of the acute scarring response to the implant of different types of biomaterial in the abdominal wall. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:25-29.
54. 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;140:6-11.
55. Bellon JM, Bujan J, Contreras L, Hernando A. Integration of biomaterials implanted into abdominal wall : process of scar formation and macrophage response. *Biomater* 1995;16:381-387.
56. Bellon JM, Jurado F, Carcia-Honduvilla N, lopez R, Carrera-San Martin A, Bujan J. The structure of a biomaterial rather than its chemical composition modulates the repair process at the peritoneal level. *Am J Surg* 2002;184:154-159.
57. Clowes AW, Kirkman TR, Reidy MA. Mechanisms of arterial graft healing : Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. *Am J Pathol* 1986;123:220-230.
58. Mellander S, Fogelstrand P, Enocson K, Johansson BR, Mattsson E. Healing of PTFE grafts in a pig model recruit neointimal cells from different sources and do not endothelialize. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:63-70.
59. Bax DN, Wang Y, Li Z, Maitz PK, McKenzie DR, Bilek MM, Weiss AS. Binding of the cell adhesive protein tropoelastin to the PTFE through plasma immersion ion implantation treatment. *Biomaterials* 2011;32:5100-5111.

60. Dahlin C, Simion M, Nanmark U, Sennerby L. Histological morphology of the ePTFE-tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment. *Clin Oral Impl Res* 1998;9:100-106.
61. Watase M, Kambayashi J, Itoh T, Tsuji Y, Kawasaki T, Shiba E, Sakon M, Mori T, Yashika K, Hashimoto PH. Ultrastructural analysis of pseudo-intimal hyperplasia of polytetrafluoroethylene prostheses implanted into the venous and arterial systems. *Eur J Vasc Surg* 1992;6:371-380.
62. Butt HJ, Jaschke M. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 1995;6:1-7.
63. Hertz H. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* 1881;92:156-171.
64. Kalaba S, Gerhard E, Winder JS, Pauli EM, Haluck RS, Yang J. Design strategies and applications of biomaterials and devices for hernia repair. *Bioactive Materials* 2016;1:2-17.
65. 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;20:362-367.
66. Kimber CP, Dunkley MP, Haddock G, Robertson L, Carey FA, Cuschieri A. Patch incorporation in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000;35:120-123.
67. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677-689.
68. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001;294:1708-1712.
69. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:211-224.
70. Liu W, Thomopoulos S, Xia Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Adv Healthc Mater* 2012;1:10-25.

71. Mayer S, Decaluwe H, Ruol M, Manodoro S, Kramer M, Till H, Deprest J. Diaphragm repair with a novel cross-linked collagen biomaterial in a growing rabbit model. *PLoS One* 2015;10:e0132021. doi: 10.1371/journal.pone.0132021.
72. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* 2007;318:426-430.
73. Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials : synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. *Chem Rev* 2014;114:5057-5115.
74. Bernsmann F, Voegel JC, Ball V. Different synthesis methods allow to tune the permeability and permselectivity of dopamine-melanin films to electrochemical probes. *Electrochim Acta* 2011;56:3914-3919.
75. Langmuir I, Schaeffer VJ. Composition of fatty acid films on water containing calcium or barium salts. *J Am Chem Soc* 1936;58:284-287.
76. 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;47:3541-3550.
77. Ponzio F, Barthes J, Bour J, Bertani P, Hemmerlé J, d'Ischia M, Ball V. Oxidant control of polydopamine surface chemistry in acids : a mechanism-based entry to superhydrophilic-superoleophobic coatings. *Chem Mater* 2016;28:4697-4705.
78. Ponzio F, Payamyar P, Schneider A, Winterhalter M, Bour J, Addiego F, Krafft MP, Hemmerle J, Ball V. Polydopamine Films from the Forgotten Air/Water Interface. *J Phys Chem Lett* 2014;5:3436-3440.
79. Ponzio F, Le Houerou V, Zafeiratos S, Gauthier C, Garnier T, Jierry L, Ball V. Robust alginate-catechol-polydopamine free-standing membranes obtained from the water/air interface. *Langmuir* 2017;33:2420-2426.
80. Steigman SA, Oh JT, Almendinger N, Javid P, LaVan D, Fauza D. Structural and biomechanical characteristics of the diaphragmatic tendon in infancy and childhood : an initial analysis. *J Pediatr Surg* 2010;45:1455-1458.

81. Böhm G, Binnebösel M, Krähling E, Schumpelick V, Steinau G, Stanzel S, Anurov M, Titkova S, Ottinger A, Speer M. Influence of the elasticity module of synthetic and natural polymeric tissue substitutes on the mobility of the diaphragm and healing process in a rabbit model. *J Biomater Appl* 2011;25:771-793.
82. Gucciardo L, Ozog Y, Rusconi S, Lories R, Damink LO, Deprest J. Full thickness abdominal wall defect in growing rats as a model for congenital diaphragmatic hernia prosthetic repair. *J Pediatr Surg* 2014;49:1458-1465.
83. Korhonen RK, Saarakkala S (2011). *Biomechanics and Modeling of Skeletal Soft Tissues, Theoretical Biomechanics*, Dr Vaclav Klika (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/19975. Available from: <https://www.intechopen.com/books/theoretical-biomechanics/biomechanics-and-modeling-of-skeletal-soft-tissues>
84. Chuong CJ, Sacks MS, Johnson RL Jr, Reynolds R. On the anisotropy of the canine diaphragmatic central tendon. *J Biomech* 1991;24:563-576.
85. Margulies SS, Lei GT, Farkas GA, Rodarte JR. Finite-element analysis of stress in the canine diaphragm. *J Appl Physiol* 1994;76:2070-2075.
86. Gaur P, Chawla A, Verma K, Mukherjee S, Lalvani S, Malhotra R, Mayer C. Characterisation of human diaphragm at high strain rate loading. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;60:603-616.
87. Brunon A, Bruyère-Garnier K, Coret M. Characterization of the nonlinear behaviour and the failure of human liver capsule through inflation tests. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;4:1572-1581.
88. Jayyosi C, Coret M, Bruyère-Garnier K. Characterizing liver capsule microstructure via in situ bulge test coupled with multiphoton imaging. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;54:229-243.
89. Martins PALS, Natal Jorge RM, Ferreira AJM. A comparative study of several material models for prediction of hyperelastic properties : application to silicone-rubber and soft tissues. *Strain* 2006;42:135-147.
90. Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 2006;17:89-106.

91. Khenoussi N, Schacher L, Adolphe DC. Nanofiber production : study and development of electrospinning device. *Experimental Techniques* 2012;36:32-39.
92. Beachley V, Serpe A, Hepfer RG, Wen X. Surface functionalization of electrospun polyurethane scaffolds using blended polymer solutions. *J Biomater Tissue Eng* 2013;3:1-7.
93. Khil MS, Cha DI, Kim HY, Kim IS, Bhattarai N. Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;67:675-679.
94. Park CH, Kim CH, Tijing LD, Lee DH, Yu MH, Pant HR, Kim Y, Kim CS. Preparation and characterization of (polyurethane/nylon-6) nanofiber/(silicone) film composites via electrospinning and dip-coating. *Fibers and Polymers* 2012;13:339-345.

Liste des publications

1. Barrière F, Michel F, Loundou AD, Fouquet V, Kermorvant E, Blanc S, Carricaburu E, Desrumaux A, Pidoux O, Arnaud A, Lavrand L Berte N, Blanc T, Levard G, Rayet I, Samperiz S, Schneider A, Marcoux MO, Winer N, Chaussy Y, Datin-Dorriere V, Ballouhey Q, Binet A, Muszynski C, Breaud J, Garenne A, Storme L, Boubnova J. One-year outcome for congenital diaphragmatic hernia : results from the French National Register. Journal of Pediatrics ; *En cours de révision*.
2. Sananès N, Ruano R, Weingertner AS, Regnard P, Salmon Y, Kohler A, Miry C, Mager C, Guerra F, Schneider A, Becmeur F, Leroy J, Dimarcq JL, Debry C, Favre R. Experimental fetal endoscopic tracheal occlusion in rhesus and cynomolgus monkeys : nonhuman primate models. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015;28:1822-1827.
3. Schneider A, Koob M, Sananes N, Senger B, Hemmerlé J, Becmeur F. Computed tomographic study of the pediatric diaphragmatic growth : application to the treatment of congenital diaphragmatic hernia. Eur J Pediatr Surg 2017;27:177-180.
4. 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;31:844-850.
5. Schneider A, Hemmerlé J, Allais M, Didierjean J, Michel M, Ball V. Boric acid as an efficient agent to arrest the self-assembly of polydopamine in basic conditions and influence on polydopamine's surface properties. ACS Applied Materials & Interfaces 2017;DOI: 10.1021/acsami.7b08356.

6. Ponzio F, Payamyar P, Schneider A, Winterhalter M, Bour J, Addiego F, Krafft MP, Hemmerle J, Ball V. Polydopamine Films from the Forgotten Air/Water Interface. J Phys Chem Lett. 2014;5:3436-3440.
7. Schneider A, Mathieu E, Ponzio F, Ball V, Schaaf P, Becmeur F, Hemmerlé J. Biological Responses to Polydopamine Functionalized PTFE. Acta Biomaterialia ; *Article soumis*.

Article 1

One-Year Outcome for Congenital Diaphragmatic Hernia: Results from the French National Register

François Barrière¹, Fabrice Michel¹, Anderson D. Loundou², Virginie Fouquet³, Elsa Kermorvant⁴, Sébastien Blanc⁵, Elisabeth Carricaburu⁶, Amélie Desrumaux⁷, Odile Pidoux⁸, Alexis Arnaud⁹, Nicolas Berte¹⁰, Thierry Blanc¹¹, Frederic Lavrand¹², Guillaume Levard¹³, Isabelle Rayet¹⁴, Sylvain Samperiz¹⁵, Anne Schneider¹⁶, Marie-Odile Marcoux¹⁷, Norbert Winer¹⁸, Yann Chaussy¹⁹, Valérie Datin-Dorriere²⁰, Quentin Ballouhey²¹, Aurélien Binet²², Charles Muszynski²³, Jean Breaud²⁴, Armelle Garenne²⁵, Laurent Storme²⁶, Julia Boubnova²⁷ on behalf of the Center for Rare Diseases for Congenital Diaphragmatic Hernia

¹ Pediatric Intensive Care Unit, La Timone Children Hospital, AP-HM, Aix-Marseille University, Marseille, France

² Department of Public Health, AP-HM, Aix-Marseille University, Marseille, France

³ Department of Pediatric Surgery, Paris South University Hospitals, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴ Neonatal Intensive Care Unit, Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris Descartes University, Paris, France

⁵ Neonatal Intensive Care Unit, HFME University Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

⁶ Department of Pediatric Surgery, Robert-Debré Hospital, AP-HP, Paris, France

⁷ Neonatal Intensive Care Unit, Couple-Enfant Hospital, Grenoble, France

⁸ Department of Neonatology, University Hospital, Montpellier, France

⁹ Department of Pediatric Surgery, Hôpital Sud, University Hospital, Rennes, France

¹⁰ Department of Surgery, University Hospital, Nancy, France

¹¹ Neonatal Intensive Care Unit, University Hospital, Rouen, France

¹² Department of Pediatric Surgery, University of Bordeaux, Pellegrin-Enfant Hospital, Bordeaux, France

¹³ Department of Pediatric Surgery, University Hospital, Poitiers, France

¹⁴ Neonatal and Pediatric Intensive Care Unit, Hôpital Nord, Saint-Etienne, France

¹⁵ Neonatal and Pediatric Intensive Care Unit, Felix Guyon Hospital, La Réunion, France

¹⁶ Department of Pediatric Surgery, Hautepierre Hospital University Medical Center, Strasbourg, France

¹⁷ Neonatal Intensive Care Unit, Hôpital des Enfants, Toulouse, France

¹⁸ Department of Gynecology and Obstetrics, Hôtel-Dieu University Hospital, Nantes, France

- ¹⁹ Department of Pediatric Surgery, Jean Minjoz University Hospital, Besançon, France
- ²⁰ Neonatal Intensive Care Unit, Côte de Nacre University Hospital, Caen, France
- ²¹ Department of Pediatric Surgery, University Hospital, Limoges, France
- ²² Department of Pediatric Surgery, Clocheville University Hospital, Tours, France
- ²³ Department of Obstetrics and Gynecology, Amiens University Hospital, Amiens, France
- ²⁴ Department of Pediatric Surgery, Nice Pediatric Hospital, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France
- ²⁵ Pediatric Department, Brest University Hospital, Brest, France
- ²⁶ Department of Neonatal Medicine, Lille University Hospital, Lille, France
- ²⁷ Department of Pediatric Surgery, La Timone Children Hospital, AP-HM, Aix-Marseille University, Marseille, France

Under submission

Abstract:

Objective: To obtain a state of play of the congenital diaphragmatic hernia (CDH) management in France and to assess prenatal and postnatal predictors of adverse outcomes.

Methods: We reviewed the first-year outcome of all cases of CDH diagnoses and reported to the French National Register between January 1 and December 31, 2011.

Results: One hundred fifty-eight cases were included. Of these, 131 (83%) were prenatally diagnosed with a mortality rate of 39%, and 47% included termination of pregnancy (TOP) and fetal loss (FL) in contrast with the 7% mortality rate of the 27 (17%) postnatally diagnosed ($p = 0.002$). A cumulative effect of the prenatal marker of CDH severity was observed with a significant worse mortality rate with one marker (OR 3.38 [1.30–8.83], $p = 0.013$) and at least two markers (OR 20.64 [5.29–80.62] $p < 0.001$). Classical postnatal risk factors of mortality were confirmed as side of hernia (non-left $p = 0.001$), preterm ($p < 0.001$), low birth weight ($p = 0.002$), and size of the defect ($p < 0.001$). Of the 141 cases of live birth, 93 (67%) survived at hospital discharge, 68 (60%) with prenatal diagnosis, and 25 (93%) with postnatal diagnosis, with a median time to hospital discharge of 34 days [IQR, 19.25–62]. Of these 93 survivors, 71 (76%) were followed up to 1 year.

Conclusion: Despite advances in management of CDH, mortality remains high, related to prenatal evaluation. Postnatal evaluation, marked by persistent pulmonary hypertension, remains difficult to predict, and management remains a major challenge.

Background:

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a severe congenital anomaly (MIM 142340) [1,2] related to a developmental defect of the diaphragm that occurs in approximately 1 in 3,000 live births [3]. In 2015, The EUROCAT Working Group published a total prevalence of 2.3 per 10,000 births [4]. Although advances in neonatal intensive care have improved the prognosis, mortality remains high, around 30–40% [2,5] and up to 50% in population-based studies [6], and is related to severe lung hypoplasia and persistent pulmonary hypertension. The prognosis is even worse for patients with chromosomal abnormalities or associated organ malformation [7,8]. Moreover, it is difficult to predict the outcome accurately for isolated CDH. Prenatal evaluation with observed/expected lung-over-head ratio (o/e LHR), liver position, and total lung volume measured by magnetic resonance have been shown to correlate with neonatal morbidity and mortality [9–11]. Nevertheless, postnatal evaluation remains unclear [12–14], marked by the preponderant role of persistent pulmonary hypertension, which remains difficult to predict prenatally.

A prospective, population-based survey was initiated in 2007 to collect data on all CDH diagnosed in France, coordinated by the National Reference Center for CDH, located at the Marseille University Hospital.

The primary objective of this study was to obtain a state of play of the CDH management in France by reporting the one-year outcome for all diagnosed CDH included in the French register in 2011, and the secondary objective was to assess prenatal and postnatal predictors of adverse outcomes.

Methods:

The French National survey included the 34 centers that care for CDH. Data collected included general characteristics of the prenatal care, neonatal management, and medical follow-up for survivors. All data were recorded by each center through a web-based questionnaire accessible by a password. The present study concerned the first-year outcome of all cases of CDH diagnosed and reported to the registry between January 1 and December 31, 2011. Extracted data from these cases were anonymized, and this study received the approval of the Ethical Committee of the French Society of Anesthesia and Intensive Care (Comité d'éthique pour la recherche en Anesthésie-Réanimation, IRB 00010254 - 2016 - 062).

Prenatal management and prenatal evaluation

For each prenatal diagnosis, in utero information on pregnancies was collected, including the term of diagnosis; the lung-over-head ratio (LHR), computed by multiplying the two longest perpendicular diameters of the contralateral lung at the level of the four-chamber view of the heart and dividing this by the head circumference [15,16]; and the observed/expected LHR (o/e LHR), irrespective of the gestational age. If there was more than one LHR or o/e LHR, the lower ratio was analyzed. Position of the liver (up in thorax or down in abdomen) and total observed/expected lung volume (o/e TLV) measured by magnetic resonance imaging (MRI) [17,18] were also recorded. Prenatal markers of CDH severity were defined as a CDH with lowest LHR ≤ 1 , liver up, lowest o/e LHR $\leq 25\%$, and o/e TLV reported $\leq 25\%$. The presence of at least one of these markers or prenatal intervention as temporary percutaneous fetoscopic endoluminal tracheal occlusion (FETO) [19] defined severe prenatal CDH. Isolated CDH was defined as a CDH without chromosomal abnormalities or ultrasound anomaly, in opposition with non-isolated CDH, showing at least one other anomaly (classified as such anomalies as cardiac malformations, pulmonary malformations, omphalocele, hepatopulmonary fusion, esophageal atresia, fetal acrania, anomalies of the vertebral column, hydrops fetalis with polymalformative syndrome; or minor anomalies such as ocular malformation, foot malposition, bowel malrotation, and congenital malformations of the kidney and the urinary tract).

Postnatal evaluation

For all live births, hospital of birth, delivery mode, term, birth weight, and Apgar score, need for oxygen therapy at 28 days, high-frequency oscillation ventilation (HFOV) or extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), presence of pulmonary hypertension at 48 hours (defined by pulmonary artery systolic pressure above 40 mm Hg), and surgical management were collected. An

operative report indicated a classification of the defect size into four types (A–D) according to the CDH Study Group [20].

Outcome

For all survivors, age and outcome at hospital discharge were obtained. Cardio-respiratory, nutritional, and neurologic status were also collected at 6 months and 1 year, according to a standardized protocol established by the members of the Center for Rare Disease [21] and the CDH EURO Consortium [22]. Oral disorder was defined by gastroesophageal reflux disease and/or swallowing disorders. Nutritional support included enteral feeding by gastric probe or gastrostomy. Assessment of neurological outcome was made using items from an Amiel-Tison neurological evaluation [23]. Neurological status was defined as normal, developmental delay, or cerebral palsy, according to Hagberg.

Statistical analyses

All descriptive data were presented as percentage or median and interquartile range. Statistical analyses were performed using PASW Statistics 17.0. A p value <0.005 was considered statistically significant.

Results:

In 2011, from the French National CDH registry, a total of 158 cases of CDH were included from 26 centers. Of these cases, 131 were prenatally diagnosed (83%) and 27 postnatally (17%).

Out of the 131 prenatal diagnoses, 114 resulted in a live birth (87%), 14 cases resulted in termination of pregnancy (TOP, 11%), two cases in a fetal loss (FL, 2%), and 1 unknown outcome. Among 114 live births, no outcome was documented for two, and the mortality rate at discharge was 39% (44/112), or 47% (60/128) if including TOP and fetal loss. In total, 53 of the 68 infants alive at hospital discharge were followed up to 1 year (78%), two patients were lost to follow-up before 6 months and 12 before 1 year. One patient died between 6 months and 1 year.

Out of the 27 postnatal diagnoses, the mortality rate at discharge was 7% (2/27). In total, 18 of the 25 infants alive at hospital discharge were followed up to 1 year (72%), 6 cases were lost to follow-up before 6 months and one before 1 year (Figure 1).

Prenatal management and prenatal evaluation

Prenatal diagnosis was performed in 131 cases. The median gestational age at diagnosis was 24 GW [Interquartile range, 22–32]. Four (3%) cases were diagnosed in the first trimester, 94 (72%) and 33 (25%), respectively, in the second and the third trimester. The CDH was left-sided in 114 (87%) cases, right-sided in 15 (11%), and bilateral in two cases.

Karyotypes were performed prenatally in 101 cases. Three (3%) chromosomal abnormalities were identified (one trisomy 18 and 2 deletions: 21q22.3 deletion and 8p23.1 deletion). Moreover, 3 de

novo balanced translocations were identified (t [5;13], t [6;21] and t [1;18]). An additional chromosome anomaly was identified on a postnatal analysis (8p23.1 deletion).

Other ultrasound anomalies were detected prenatally for 18 (14%) cases. Postnatal explorations found other malformations in five cases.

In total, 105 (80%) were isolated CDH and 26 (20%) were non-isolated CDH. The mortality rate at discharge was 34% for isolated CDH versus 61% for non-isolated-CDH ($p = 0.033$), and 40% versus 69% including TOP and FL ($p = 0.007$).

Outcome based on prenatal markers of CDH severity (LHR, o/e LHR, intrathoracic position of liver, and o/e TLV) and severe prenatal CDH are summarized in Table 1. For 12 (9%) cases, percutaneous temporary fetoscopic endoluminal tracheal occlusion (FETO) was done (8 non-survivors, 3 survivors, and 1 missing data).

Concerning the 14 terminations of pregnancy (11% of prenatal diagnosis), the decision was based on an anticipated poor prognosis in view of prenatal markers of CDH severity (8), the presence of chromosomal and/or major congenital anomaly (4), isolated parental demand (1), and unspecified (1). No autopsy was performed in two fetal losses.

Neonatal care

General neonatal characteristics of the 141 live births are summarized in Table 2, including cardio-respiratory status and surgical management. Overall median gestational age (weeks) was 38 [36–40] (39 [37–40] in survivors and 37 [33–39] in non-survivors [$p < 0.001$]). Median birth weight (g) was 2908 [2555–3312], 3000 [2640–3420] in survivors and 2629 [1810–3140] in non-survivors ($p = 0.002$).

Concerning the 46 deaths (44 prenatal diagnosis and two postnatal diagnosis), 28 (61%) occurred in the first week (21 (46%) in 0–2 days, non-operated), 10 (22%) in 7–28 days, and 8 (17%) after 28 days.

One-year outcome

Of these 141 live births cases, 93 (67%) survived at hospital discharge, 68 (60%) from prenatal diagnosis and 25 (93%) from postnatal diagnosis, with a median time to hospital discharge of 34 days [IQR, 19.25–62] and 73 days [IQR, 52–82] for cases requiring patch repair.

After hospital discharge, of the 93 infants alive at hospital discharge, 71 (76%) were followed up to 1 year, 8 cases were lost to follow-up before 6 months, and 14 before 1 year. For these cases, cardio-respiratory, nutritional, and neurologic status at hospital discharge, 6 months, and 1 year were summarized in Table 3 (including oxygen therapy dependence, chronic pulmonary hypertension, oral aversion, weight at 6 months and 1 year, nutritional support, and neurological status). One additional death was noted in the database at 8 months (Figure 1), due to a cardiac arrest at home secondary to bowel obstruction and severe pulmonary hypertension; autopsy found a recurrence of the hernia.

Discussion:

To date, this is one of the most complete population-based registries conducted of CDH in a single year nationwide, with continuity between the prenatal period until one year of life. This study confirms the severity of prenatal diagnosis of CDH, with a mortality rate of 39% (47% including TOP and FL) in contrast to postnatal diagnosis CDH (7%) ($p = 0.002$) and confirms the poor outcome of non-isolated CDH with a mortality rate of 60% ($p = 0.036$). Our homogeneous series shows a mortality rate substantially equivalent to that of the data already published (30–40%) [4,24], with similar risk factors to other CDH cohorts, whereas we included prenatal data and TOP cases.

The true mortality of CDH proposed by Stege [6], including TOP and FL, should be the right evaluation of CDH mortality. However, policy about TOP varies from countries, and many factors are involved in the decision to terminate. Recently, some authors [24] report high numbers of TOP for non-isolated CDH (73.9%) and 37.5% for isolated CDH. The apparent poor prognosis of non-isolated CDH in our study could be a consequence of a low TOP rate (11% of prenatal diagnosis). Prenatal markers for TOP in our cohort were poorer than those that carried to term.

According to prenatal evaluation, the presence of prenatal markers of CDH severity was associated with a significantly worse mortality rate, testifying to a good assessment of the degree of pulmonary hypoplasia. Moreover, this study has shown a cumulative effect of these prenatal markers with a significantly worse mortality rate. The odds of mortality in cases with one marker are three times that of cases with no markers. With at least two markers, the odds of mortality are 20 times greater. In this last subgroup, only three survivors benefited from prenatal interventions such as FETO. However, to date, according to the Cochrane study [25], there is currently insufficient evidence to recommend in utero intervention for fetuses with CDH as a part of routine clinical practice. It should be strongly recommended to perform FETO only in research protocol as suggested by Deprest [26], and our hopeful data are not sufficient to actually recommend a spreader use.

Moreover, our comprehensive follow up confirms the previously reported risk factors of mortality from CDH, including right-side, premature birth, and low birth weight. Recently, postnatal evaluation with a clinical scoring system was introduced by the CDH Study Group [13] (based on five items: Apgar score, low birth weight, major cardiac anomaly, chromosomal anomaly, and severe pulmonary hypertension on first echocardiogram). These items remain pertinent in our study, with few limitations.

The 5-min Apgar score was difficult to interpret (with cases requiring mechanical ventilation before 5-min and unable to obtain this score). However, a good 5-min Apgar score (≥ 7) is correlated with a good outcome. Birth weight is more pertinent, with only one postnatal diagnosis with low birth weight (<1500 g) surviving and no survivors with a prenatal diagnosis and weighing less than 2000 g. Prognosis of CDH with major cardiac anomaly or chromosomal abnormality is poor. Finally, the most important item should be the presence of severe pulmonary hypertension on first echocardiogram. The

pulmonary hypertension evaluation in our population-based database was noted at 48 hours of life, whereas the majority of deaths occurred prematurely (46% in the first 48 hours).

The physiopathology of pulmonary hypertension was recently described [27]; it is marked by altered vasoreactivity, pulmonary artery remodeling, and hypoplastic pulmonary vascular bed. Despite the current large therapeutic arsenal (including gentle ventilation and permissive hypercapnia concepts, prostaglandin E1 to keep open or reopen a patent ductus arteriosus, inhaled nitric oxide, Sildenafil, Bosentan, Prostacyclins, Milrinone, and, as a last resort, ECMO [28]), there is no consensus for introduction of any of these. Furthermore, prospective randomized trials are necessary to standardize the use of these treatments, effective on reversible components but not in refractory pulmonary hypertension, to avoid futile and invasive treatments in specific situations. Monitoring brain-type natriuretic levels [29] or oxygenation index [30] could be useful prognostic tools.

Another postnatal evaluation analyzed by the CDH Study Group was the size of the defect (classification A, B, C, and D) and the subsequent need of patch repair [31,32]. With this classification, we reported a 97% (33/34) survival rate with defect A or B and 60% (19/32) with defect C or D ($p < 0.001$). In groups A or B, no patch repair was reported, and in group C or D, 23/32 required patch repair. These results confirm the usefulness of this classification.

Right-side hernia as a risk factor of poor outcome is sometimes controversial in many studies [33,34]. In our work, the outcome of right-side CDH remains poor: 11 non-survivors and 4 survivors (non-left $p = 0.001$).

We are able to report one year follow up for 76% (71/93) of living children at hospital discharge. The lost to follow-up occurs mainly between discharge and 6 months for postnatal diagnosis and between 6 months and 1 year for prenatal diagnosis. These results are consistent with the literature [35–38]. Although we observed an improvement in cardio-respiratory parameters (decrease of oxygen dependence and pulmonary hypertension), oral disorder and required nutritional support are persistent, probably to optimize weight gain. Increase of neurological abnormalities was detected; this morbidity, known to affect the quality of life in CDH survivors [39], seems higher when a patch repair has been required.

Conclusions:

Our comprehensive follow up from prenatal period (included TOP cases) to one year outcomes validate most of less exhaustive previous analysis. Despite advances in the management of CDH, mortality remains high, related to severe lung hypoplasia and pulmonary hypertension, especially in prenatal diagnosis of CDH, with a 39% mortality rate (46% including TOP and FL) versus 7% for postnatal diagnosis CDH, and poor outcomes for non-isolated CDH and severe prenatal CDH. Morbidity evolved; in the foreground initially, pulmonary hypertension diminished between 6 months and one year. However, gastrointestinal difficulties (including oral disorder and nutritional support)

persist (with an optimization goal of weight gain), and neurological abnormalities could develop, predominately in several forms requiring patch repair, justifying long-term follow-up.

Prenatal evaluation based on ultrasound (for LHR, o/e LHR, liver position, and eventual anomalies), karyotype +/- microarray, and MRI (for o/e TLV) seems effective to predict the outcome, potentially correlated with the degree of pulmonary hypoplasia.

Postnatal evolution marked by persistent pulmonary hypertension remains difficult to predict, and its management remains the major challenge. Further work is required not only to develop prenatal markers to predict persistent pulmonary hypertension reliably, which could help caregivers in counseling patients and families, but also to guide postnatal management of CDH, with possibly aggressive and costly therapeutic measures, which would not be without risks.

References:

1. Wright JCE, Budd JLS, Field DJ, Draper ES. Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 9-year experience: Congenital diaphragmatic hernia. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2011 Mar;25:144–9.
2. Tovar JA. Congenital Diaphragmatic Hernia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2012;7:1.
3. Kotecha S, Barbato A, Bush A, Claus F, Davenport M, Delacourt C, et al. Congenital diaphragmatic hernia. *Eur Resp J*. 2012 Apr;39:820–9.
4. McGivern MR, Best KE, Rankin J, Wellesley D, Greenlees R, Addor M-C, et al. Epidemiology of congenital diaphragmatic hernia in Europe: a register-based study. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2015 Mar;100:F137–44.
5. van den Hout L, Reiss I, Felix JF, Hop WCJ, Lally PA, Lally KP, et al. Risk Factors for Chronic Lung Disease and Mortality in Newborns with Congenital Diaphragmatic Hernia. *Neonatology*. 2010;98:370–80.
6. Stege G, Fenton A, Jaffray B. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics*. 2003 Sep;112:532–5.
7. Lally KP, Lasky RE, Lally PA, Bagolan P, Davis CF, Frenckner BP, et al. Standardized reporting for congenital diaphragmatic hernia--an international consensus. *J Pediatr Surg*. 2013 Dec;48:2408–15.
8. Wynn J, Krishnan U, Aspelund G, Zhang Y, Duong J, Stolar CJH, et al. Outcomes of congenital diaphragmatic hernia in the modern era of management. *J Pediatr*. 2013 Jul;163:114–119.e1.
9. Jani J, Nicolaidis KH, Benachi A, Moreno O, Favre R, Gratacos E, et al. Timing of lung size assessment in the prediction of survival in fetuses with diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Jan;31:37–40.
10. Benachi A, Cordier A-G, Cannie M, Jani J. Advances in prenatal diagnosis of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014 Dec;19:331–7.
11. Coughlin MA, Werner NL, Gajarski R, Gadepalli S, Hirschl R, Barks J, et al. Prenatally

- diagnosed severe CDH: mortality and morbidity remain high. *J Pediatr Surg.* 2016 Jul;51:1091–5.
12. Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Estimating disease severity of congenital diaphragmatic hernia in the first 5 minutes of life. *J Pediatr Surg.* 2001 Jan;36:141–5.
 13. Brindle ME, Cook EF, Tibboel D, Lally PA, Lally KP, Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. A clinical prediction rule for the severity of congenital diaphragmatic hernias in newborns. *Pediatrics.* 2014 Aug;134:e413-419.
 14. Danzer E, Hedrick HL. Controversies in the management of severe congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Dec;19:376–84.
 15. Metkus AP, Filly RA, Stringer MD, Harrison MR, Adzick NS. Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1996 Jan;31:148-151-152.
 16. Jani J, Nicolaides KH, Keller RL, Benachi A, Peralta CFA, Favre R, et al. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Jul;30:67–71.
 17. Rypens F, Metens T, Rocourt N, Sonigo P, Brunelle F, Quere MP, et al. Fetal lung volume: estimation at MR imaging-initial results. *Radiology.* 2001 Apr;219:236–41.
 18. Gorincour G, Bouvenot J, Mourot MG, Sonigo P, Chaumoitre K, Garel C, et al. Prenatal prognosis of congenital diaphragmatic hernia using magnetic resonance imaging measurement of fetal lung volume. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Dec;26:738–44.
 19. Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH, FETO Task Group. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 Aug;24:121–6.
 20. Harting MT, Lally KP. The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry update. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Dec;19:370–5.
 21. Storme L, Pennaforte T, Rakza T, Fily A, Sfeir R, Aubry E, et al. [Per and post-natal medical management of congenital diaphragmatic hernia]. *Arch Pediatr.* 2010 Sep;17 Suppl 3:S85-92.
 22. Reiss I, Schaible T, van den Hout L, Capolupo I, Allegaert K, van Heijst A, et al. Standardized postnatal management of infants with congenital diaphragmatic hernia in Europe: the CDH EURO Consortium consensus. *Neonatology.* 2010;98:354–64.
 23. Amiel-Tison C. Update of the Amiel-Tison neurologic assessment for the term neonate or at 40 weeks corrected age. *Pediatr Neurol.* 2002 Sep;27:196-212.
 24. Oh T, Chan S, Kieffer S, Delisle M-F. Fetal Outcomes of Prenatally Diagnosed Congenital Diaphragmatic Hernia: Nine Years of Clinical Experience in a Canadian Tertiary Hospital. *J Obstet Gynaecol Can.* 2016 Jan;38:17–22.
 25. Grivell RM, Andersen C, Dodd JM. Prenatal interventions for congenital diaphragmatic hernia for improving outcomes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Nov 27:CD008925.
 26. Deprest J, Brady P, Nicolaides K, Benachi A, Berg C, Vermeesch J, et al. Prenatal management

- of the fetus with isolated congenital diaphragmatic hernia in the era of the TOTAL trial. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Dec;19:338–48.
27. Pierro M, Thébaud B. Understanding and treating pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Dec;19:357–63.
 28. Nasr VG, Faraoni D, DiNardo JA, Thiagarajan RR. Association of Hospital Structure and Complications With Mortality After Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Pediatr Crit Care Med.* 2016 Jul;17:684–91.
 29. Partridge EA, Hanna BD, Rintoul NE, Herkert L, Flake AW, Adzick NS, et al. Brain-type natriuretic peptide levels correlate with pulmonary hypertension and requirement for extracorporeal membrane oxygenation in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2015 Feb;50:263–6.
 30. Ruttenstock E, Wright N, Barrena S, Krickhahn A, Castellani C, Desai AP, et al. Best oxygenation index on day 1: a reliable marker for outcome and survival in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg.* 2015 Feb;25:3–8.
 31. Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group, Lally KP, Lally PA, Lasky RE, Tibboel D, Jaksic T, et al. Defect size determines survival in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics.* 2007 Sep;120:e651–657.
 32. Brindle ME, Brar M, Skarsgard ED, Canadian Pediatric Surgery Network (CAPSNet). Patch repair is an independent predictor of morbidity and mortality in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 2011 Sep;27:969–74.
 33. Schaible T, Kohl T, Reinshagen K, Brade J, Neff KW, Stressig R, et al. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: postnatal outcome at a specialized tertiary care center. *Pediatr Crit Care Med.* 2012 Jan;13:66–71.
 34. Partridge EA, Peranteau WH, Herkert L, Rendon N, Smith H, Rintoul NE, et al. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: a comparative outcomes analysis. *J Pediatr Surg.* 2016 Jun;51:900–2.
 35. Peetsold MG, Heij HA, Kneepkens CMF, Nagelkerke AF, Huisman J, Gemke RBBJ. The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity. *Pediatr Surg Int.* 2009 Jan;25:1–17.
 36. Pennaforte T, Rakza T, Fily A, Mur S, Diouta L, Sfeir R, et al. [The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: review of the literature]. *Arch Pediatr.* 2013 Sep;20 Suppl 1:S11–18.
 37. Kays DW, Islam S, Perkins JM, Larson SD, Taylor JA, Talbert JL. Outcomes in the physiologically most severe congenital diaphragmatic hernia (CDH) patients: Whom should we treat? *J Pediatr Surg.* 2015 Jun;50:893–7.
 38. Bojanić K, Grubić M, Bogdanić A, Vuković J, Weingarten TN, Huebner AR, et al. Neurocognitive outcomes in congenital diaphragmatic hernia survivors: a cross-sectional

prospective study. J Pediatr Surg. 2016 Oct;51:1627–34.

39. Michel F, Baumstarck K, Gosselin A, Le Coz P, Merrot T, Hassid S, et al. Health-related quality of life and its determinants in children with a congenital diaphragmatic hernia. Orphanet J Rare Dis. 2013 Jun 20;8:89.

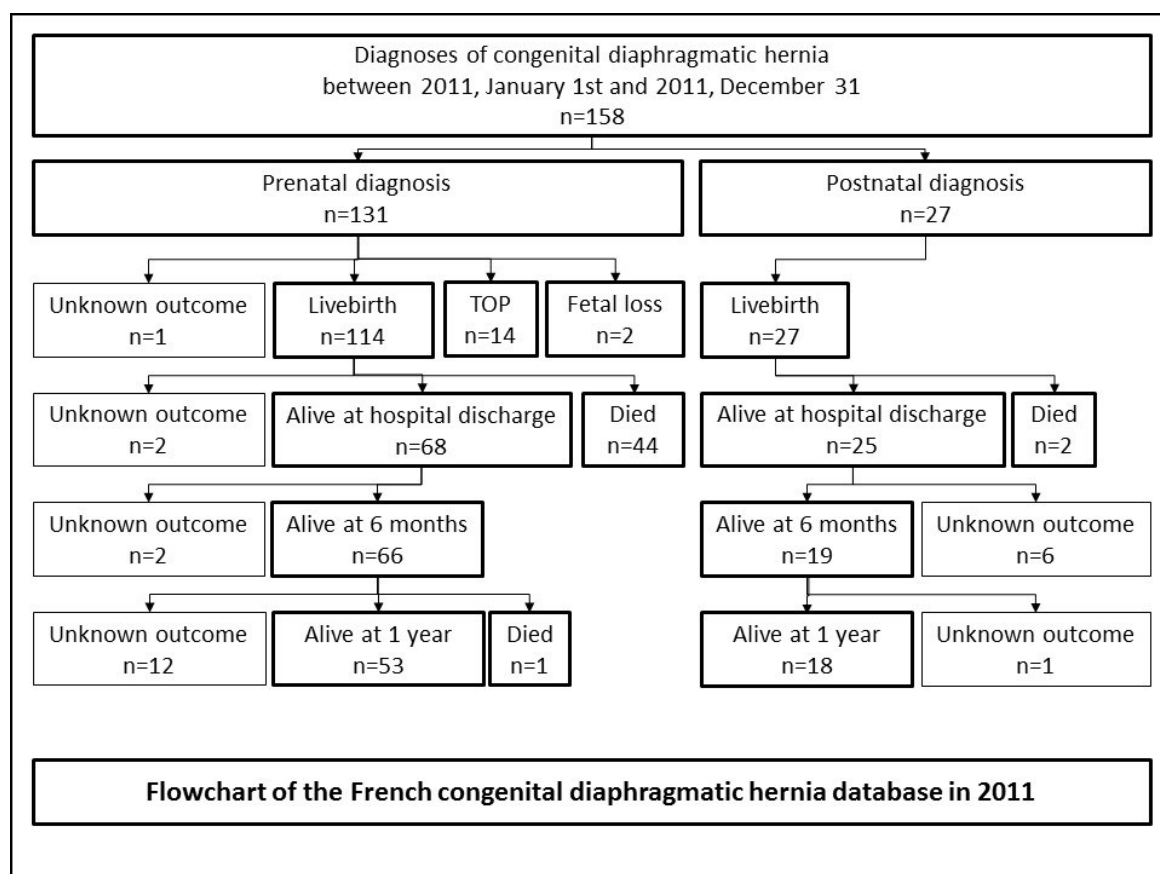


Figure 1. Overall outcome of all cases in the French congenital diaphragmatic hernia database in 2011

Table 1. Outcome based on prenatal markers of CDH severity

	<i>n</i> (%)	TOP	FL	Survivors	Non-survivors	OR	<i>p</i> value
LHR							
≤1	26 (25)	7	1	3	14	16.12 [3.91–66.43]	<0.001
1–1.3	25 (24)	0	1	14	8	1.91 [0.66–5.92]	0.225
>1.3	54 (51)	5	0	38	11	1 [Ref.]	
o/e LHR							
≤25%	15 (15)	3	1	0	10	NA	NA
25–45%	53 (52)	6	1	26	18	4.67 [1.39–15.67]	0.013
>45%	34 (33)	3	0	27	4	1 [Ref.]	
Liver position							
up	48 (42)	6	1	14	25	6.70 [2.69–16.69]	<0.001
down	67 (58)	8	1	45	12	1 [Ref.]	
o/e TLV							
≤25%	19 (44)	3	0	3	12	24 [4.13–139.38]	<0.001
>25%	24 (56)	1	2	18	3	1 [Ref.]	
1 pm	29 (22)	1	0	14	13	3.38 [1.30–8.83]	0.013
At least 2 pm	29 (22)	7	1	3*	17	20.64 [5.29–80.62]	<0.001
No pm	73 (56)	6	1	51	14	1 [Ref.]	

TOP, termination of pregnancy; FL, fetal loss; LHR, lung-over-head ratio; o/e LHR, observed/expected, whatever gestational age lung-over-head ratio; o/e TLV, observed/expected total lung volume; pm, prenatal marker of CDH severity

The OR is predicting the odds of death from non-survivors

*Cases requiring prenatal intervention such as temporary percutaneous fetoscopic endoluminal tracheal occlusion (FETO)

Table 2. General characteristics of live-birth CDH included in French database in 2011

General characteristics		n (%)	Survivors	Non-survivors	p value
Gender	male	70 (51)	50	20	0.276
	female	67(49)	42	25	
Side of hernia	left	111 (88)	78	33	0.001
	non-left	16 (12)	4	12	
Diagnosis	prenatal	112 (81)	68	44	0.002
	postnatal	27 (19)	25	2	
Hospital of birth	inborn	106 (80)	69	37	0.208
	outborn	27 (20)	21	6	
Gestational age	<37 GW	38 (27)	16	22	<0.001
	≥37 GW	101 (73)	77	24	
Delivery mode	caesarean	50 (37)	26	24	0.006
	vaginal delivery	84 (63)	63	21	
5-min Apgar score	≥7	22 (19)	21	1	0.001
	<7 or no Apgar	92 (81)	55	37	
CR status	O2 at 28d.	31 (33)	23	8	0.002
	no O2	62 (67)	60	2	
	PPHN at 48h.	63 (55)	35	28	<0.001
	no PPHN	51 (45)	45	6	
	HFOV	66 (56)	34	32	<0.001
	no HFOV	52 (44)	47	5	
	ECMO	7 (6)	4	3	0.429
	no ECMO	109 (94)	77	32	
Surgical management	surgery done	114 (82)	93	21	<0.001
	no surgery	25 (18)	0	25	
	surgery <48h	56 (63)	51	5	0.001
	>48h	33 (37)	20	13	
	patch repair	28 (31)	18	10	0.006
	no patch	62 (69)	55	7	
	defect C/D	32 (48)	19	13	<0.001
	defect A/B	34 (52)	33	1	

Born in hosp, birth in a tertiary perinatal center; GW, gestational weeks; CR status, cardio-respiratory status; O2 at 28d., oxygen dependency at 28 days; PPHN at 48h., persistent pulmonary hypertension at 48 hours; HFOV, cases requiring high-frequency oscillation ventilation; ECMO, cases requiring extracorporeal membrane oxygenation

Table 3. Evaluation at hospital discharge, 6 months, and 1 year (*cases requiring patch repair reported in brackets*)

Total n = 71 (Patch repair n = 15)	At hospital discharge (Patch repair)	At 6 months (Patch repair)	At 1 year (Patch repair)
Oxygen therapy	15*; 2 NIV (9*; 0 NIV)	4; 1 NIV (2; 0 NIV)	0 (0)
PH (or treatment)	11 (6)	6 (3)	0 (0)
Median weight (g) [IQR]	NA (NA)	6700 [6010-7390] (5928 [5050-7118])	9050 [8000-9560] (8150 [7657-9160])
Oral disorder	13 (5)	12 (7)	8 (4)
Nutritional support	11 (8)	8 (6)	9 (5)
Abnormal neurological status	4 (1)	6 (4)	8 (4)

PH, pulmonary hypertension; NIV, non-invasive ventilation

*Oxygen dependency at 28 days

ORIGINAL ARTICLE

Experimental fetal endoscopic tracheal occlusion in rhesus and cynomolgus monkeys: nonhuman primate models

Nicolas Sananès^{1,2}, Rodrigo Ruano³, Anne-Sophie Weingertner¹, Pierrick Regnard⁴, Yves Salmon⁴, Anne Kohler¹, Claire Miry¹, Cécile Mager¹, Fernando Guerra¹, Anne Schneider⁵, François Becmeur⁵, Joël Leroy⁶, Jean-Luc Dimarcq⁷, Christian Debry⁸, and Romain Favre¹

¹Department of Fetal Medicine, Strasbourg Teaching Hospital, France, ²INSERM, UMR-S, "Biomatériaux et Bioingénierie", Strasbourg Cedex, France, ³Texas Children's Fetal Center and Baylor College of Medicine, USA, ⁴SILABE – ADUEIS Platform, Niederhausbergen, France, ⁵Department of Pediatric Surgery, Strasbourg Teaching Hospital, France, ⁶IRCAD – EITS, Strasbourg Teaching Hospital, France, ⁷Scientific foundation IHU Strasbourg, France, and ⁸Department of Ear, Nose and Throat, Strasbourg Teaching Hospital, France

ABSTRACT

Objective: The monkey model is the best model to investigate some physiological response to the fetal transitory tracheal occlusion but it has never been described in *Macaca* monkeys. The aim of this study was to evaluate the feasibility of fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO) in a non-human primate model.

Methods: Pregnant rhesus monkeys and cynomolgus were tested as a potential experimental model for FETO in the third trimester of pregnancy, by performing fetal tracheoscopies with and without tracheal occlusion.

Results: A total of 22 pregnancies were followed in 16 monkeys and underwent fetal surgery. Percutaneous endoscopic access to the uterine cavity was possible in 20 cases (91%). Of these 20 pregnant monkeys, fetal tracheoscopy could be achieved in 15 cases (75%). In rhesus monkeys, the time between the onset of endoscopy and tracheal penetration decreases as operator experience increases. Neither maternal morbidity nor mortality was related to surgery. Two fetal losses were possibly due to the procedure.

Conclusion: FETO is feasible in the non-human primate, which closely reflects procedures in humans. The non-human primate model for FETO, specially the rhesus monkeys, may be useful for future studies concerning the mechanisms related to the lung growth after transitory fetal tracheal occlusion.

Keywords

Cynomolgus monkey, endoscopic surgery, fetal endoscopic tracheal occlusion, non-human primate, rhesus monkey

History

Received 24 May 2014

Accepted 22 September 2014

Published online 9 October 2014

Introduction

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is one of the most common isolated fetal malformations. CDH occurs in 1/3000 to 1/5000 live births [1]. CDH is associated with hypoplasia of both lungs, which affects airways and vessels with subsequent pulmonary hypertension. This leads to approximately 30% neonatal mortality in tertiary centres, even though CDH is a surgically correctable defect [2]. Promoting lung growth during fetal life is therefore of benefit.

Fetal tracheal occlusion (TO) increases airway pressure and prevents egress of lung fluid, leading to improved growth of the alveolar airspace and maturation of the pulmonary vasculature [3]. A minimally invasive approach has been developed which is known as fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO) [4,5]. A thin endoscope is percutaneously introduced into the fetal trachea in order to position a

detachable balloon between the carina and vocal cords at between 27 and 30 weeks. The balloon is ideally removed prenatally by fetal tracheoscopy or punctured by ultrasound-guided needle at around 34 weeks. Several studies have shown an improvement of neonatal survival in severe cases [6,7].

Different animal models have been used to study the effect of TO on lung growth: sheep (*Ovis aries*), rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). Every model has strengths and weaknesses which vary depending on ethical issues, cost, animal and lung size, surgical difficulty, abortion rates, alveolarization timing, genome knowledge, and availability of genes and protein sequences [3]. For this purpose, the sheep model has been used for endoscopic TO, but unfortunately this model does not represent entirely the same condition observed in humans [8,9]. A non-human primate model may be a relevant translational model for fetal surgery, especially FETO, because both anatomy and physiology are closed to humans [3,10]. There are only few studies evaluating fetal surgery in monkeys and only three cases of FETO in baboons (*Papio spp*) have been recently reported [11–14]. In addition, to our

Address for correspondence: Dr. Nicolas Sananès, Service de Gynécologie Obstétrique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg cedex, France. Tel: +33 3 88 12 78 39. E-mail: nicolas.sananès@chru-strasbourg.fr

knowledge, there is no study evaluating different types of monkey foetuses would be adequate as a FETO experimental model. Therefore, the objective of this study was to evaluate the feasibility of fetal surgery in non-human primates using exclusively percutaneous fetoscopy by testing two different models.

Methods

The monkeys (16 females from 6 reproduction groups) were group-housed in indoor/outdoor facilities in SILABE platform (Simian Laboratory Europe). They lived in social groups (1 or 2 adult males and 4 to 10 females) in indoor/outdoor facilities of approximately 40 to 85 m³ for the indoor facility (depending on the animal facility and group) and 40 to 50 m³ for the outdoor facility. Water and food were distributed *ad libitum*. Animals were captured regularly in order to perform ultrasound to detect pregnancy and establish the gestational age. The timing of surgery was determined by ultrasound measurement of the biparietal diameter of the fetus in early pregnancy (Voluson E GE®). Pregnant rhesus monkeys (*Macaca mulata*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) underwent fetal surgery in the last third trimester of pregnancy. Pregnant female were captured on the day of the surgery. After surgery, they were isolated until the following morning and were then returned to their social group. The Regional Ethics Committee on Animal Experimentation (CREMEAS) at Strasbourg University, France (number AL/02/03/03/09) approved this study. Guidelines for the care and use of the monkeys approved by this institution were followed.

A total of 22 pregnancies (12 in rhesus and 10 in cynomolgus monkeys) were followed in 16 monkeys and subsequently underwent fetal surgery. Gestational dates were interpreted by ultrasound measurement of the biparietal diameter on average at 66 ± 15 days' gestation (40 to 110). Surgery took place on average at 133 ± 5 days' gestation (124 to 144): 135 days in rhesus and 131 days in cynomolgus, representing 81.8% of the gestational period in rhesus and 79.9% in cynomolgus monkeys, assuming gestational lengths of 165 and 164 days respectively [15].

The pregnant monkey was first sedated with ketamine (10 mg/kg, IM) before general anesthesia with propofol (5 mg/kg, IV) and 1 to 2.5% isoflurane after tracheal intubation. Ventilation was controlled by assisted mechanical respiration after tracheal intubation. Maternal breath frequency, electrocardiogram, PO₂/PCO₂ measurement, halogenated gas and temperature were continually monitored and a heating blanket was applied to maintain body temperature. Maternal blood pressure was monitored with a sphygmomanometer. A single dose of 2% marbocyl was given (Marbofloxacin 2 mg/kg, IM) prior to surgery. No tocolytic was administered.

Before surgery, fetal monkey curarization was performed by an intra-muscular injection of 0.15 to 0.20 mg cisatracurium in the fetal leg, under ultrasound guidance. After localization of the fetal head and placenta in order to determine the optimal entry site, 5 ml 2% xylocaine was injected percutaneously into the myometrium of the pregnant monkey in order to provide additional local anesthesia.

Endoscopic access was performed using the modified Seldinger technique under continuous ultrasound guidance [16,17]. A 17G needle was first introduced into the uterine cavity and an amnioinfusion of 200 to 300 mL saline administered. A guide wire was then introduced through the needle and a 10 French-gauge arterial introducer set placed over this guide. Instrument specifications for FETO procedure followed the usual recommendations [5]. A 1.3 mm fetal tracheoscope was inserted through a 3.3 mm sheath 30°-precurved with 3 side ports (11540AA and 11540KE, Karl Storz, Tuttlingen, Germany). A Goldbal 2 detachable balloon (Balt, Montmorency, France) was used for TO. Retrieval forceps (11510C, Karl Storz) and adjustable puncture stylet (11506P, Karl Storz) were used for balloon removal. Amnioinfusion of saline was performed during the procedure in order to open the fetal mouth and vocal cords.

Surgical procedures involved fetal tracheoscopies, with or without TO. When TO was performed, balloon removal was done in the same surgery session. A single operator performed all surgical procedures. Excessive amount of the infused fluid was drained through the trocar after surgery, under ultrasound guidance.

Results

Percutaneous endoscopic access inside the uterine cavity could be performed in 20 cases (91%). Of these 20 pregnant monkeys, fetal tracheoscopy was feasible in 15 cases (75%): 9 rhesus (90%) and 6 cynomolgus monkeys (60%). TO was attempted in 3 rhesus monkeys; it took place without incident, as well as the unplugging procedure.

The duration between onset of endoscopy and tracheal penetration was on average 19 ± 9 min (4 to 34): 17 ± 10 min in rhesus (4 to 35) and 22 ± 5 min in cynomolgus (13 to 28) monkeys. In rhesus monkeys, this duration decreased with increasing operator experience (Figure 1). This correlation was not replicated in the cynomolgus monkey (Figure 2).

The fetal monkey model reflects very closely human fetal anatomy. Figure 3 shows endoscopic views of the fetal monkey.

Gestational age at delivery was on average 158 ± 14 days (131 to 203). One mother died during delivery because of fetal malpresentation (arm dystocia). No other maternal mortality or morbidity was observed. There were 6 cases of

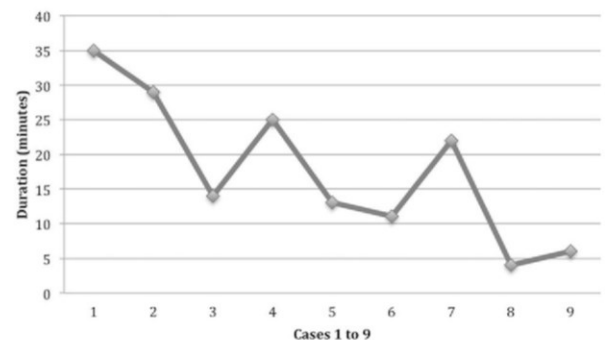


Figure 1. Duration between the beginning of endoscopy and the penetration into the trachea in fetal rhesus monkeys (first to ninth case). In rhesus monkeys, the duration between onset of endoscopy decreased with increasing operator experience.

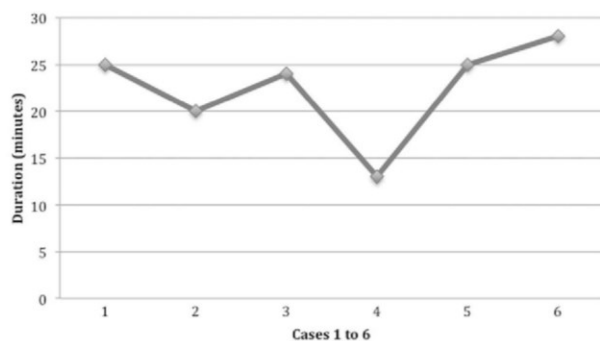
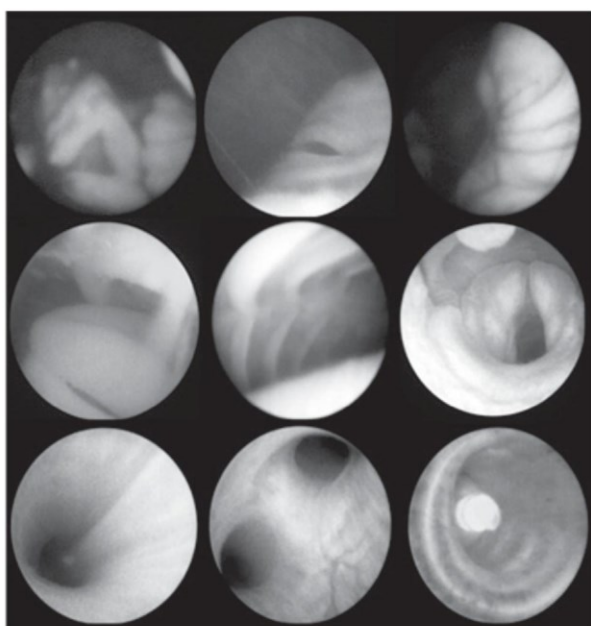


Figure 2. Duration between the beginning of endoscopy and the penetration into the trachea in fetal cynomolgus monkeys (first to sixth case). In cynomolgus monkeys, the duration between onset of endoscopy doesn't decrease with operator experience.



Hand	Eye	Profile
Mouth and tongue	Palate	Vocal cords
Trachea	Bifurcation	Balloon

The monkey model reflects closely human fetal anatomy

Figure 3. Endoscopic views of the fetal monkey.

poor neonatal outcome (27%): 2 intra-uterine fetal deaths and 4 perinatal deaths. Among these cases, only 2 fetal losses were possibly due to the surgery (9%): one intra-uterine fetal death in which fetal reversion was attempted during surgery and one perinatal death for which the only possible detected cause was *Staphylococcus aureus* in the neonatal lungs.

Characteristics of the animals, surgical details and outcomes are displayed in Table 1. Comparison between the two non-human primate models for FETO is displayed in Table 2.

Discussion

Principal findings

Our study demonstrated that non-human primate model is feasible to preform FETO, by showing that FETO was successfully performed by a single port access in all cases. Moreover, the present model, specially the Rhesus monkey, reflected anatomy on fetoscopic views very close to the human fetuses. In addition, FETO was performed mimicking the human surgery by using the same instruments. We believe that this model may be useful for future experimental studies that will investigate (1) the mechanisms related to the fetal growth after FETO [18], (2) the effects of early FETO [19], and (3) the tracheal and pulmonary effects on FETO.

Exclusive percutaneous endoscopic access to the fetal monkey with a single trocar was possible in most cases. However, in spite of the thinness of the subcutaneous layer and uterine wall in monkeys, percutaneous access is not that straightforward due to tissue elasticity. The needle has to be introduced directly, in one smooth motion, under ultrasound guidance. Amniotomies of saline is necessary because amniotic liquid is scanty in pregnant monkeys, especially in the last third of pregnancy.

Tracheoscopy was successful in three-quarters of our cases. It was much easier in rhesus monkeys than in cynomolgus ones, because the larynx and trachea are wider. When endoscopic access to the uterine cavity was successful in rhesus monkeys, tracheoscopy failed in only one case because of a problem of visibility due to bleeding. In contrast, most failed tracheoscopy attempts in cynomolgus monkeys were attributed to anatomical issues. It should be noted that the cynomolgus is still an interesting model for fetal surgery because of its non-seasonal breeding.

When TO was attempted it took place without incident. It should be noted that balloon removal was performed in the same surgery session, since the aim of this study was to evaluate the feasibility of TO in the fetal monkey, not the effect of TO on lung growth. We would suggest that other animal models are more suitable for this purpose.

All fetal losses occurred in the cynomolgus group. We assume that this mortality is partly due to a colony issue. Indeed, this group was mostly composed of relatively elder female primigravidas (around 10 years' old). Three fetal losses occurred in mature primigravidas and 2 fetal losses in females who had had a prior fetal loss. Moreover, in a control group of 6 monkeys from the same cynomolgus colony, rates of poor neonatal outcome were even higher: 50% of fetal losses and 83% of early neonatal mortality (before 7 days' life).

Finally, in our series, only 2 fetal losses occurred, which were possibly due to the surgery. It should be noted that in order to avoid premature births, surgery was scheduled for the last third trimester of pregnancy as suggested before by other investigators using the non-human primate model for other fetal surgical procedures [13,20].

Table 1. Characteristics of animals and surgeries.

Cases	Macaque ID	Subspecies	Age (years)	Weight (kg)	Parity	Previous fetal loss	GA at surgery (days)	Surgical procedure	Time to trachea (min)	GA at birth (days)	Fetal outcome	Maternal outcome	Comments
1	1	Rhesus	14.8	7.7	1	0	130	Failure of fetoscopic access	NA	173	Alive	Alive	
2	2	Rhesus	6.0	6.2	2	0	129	Foetoscopic/tracheoscopy	35	149	Alive	Alive	
3	3	Rhesus	3.0	7.1	0	0	134	Foetoscopic/tracheoscopy	29	155	Alive	Alive	
4	4	Rhesus	18.0	6.7	5	0	139	Foetoscopic/tracheoscopy	14	164	Alive	Alive	
5	5	Cynomolgus	12.0	5.9	0	0	127	Foetoscopic	NA	131	Perinatal death	Death	Arm dystocia
6	6	Cynomolgus	11.3	5.3	0	0	127	Foetoscopic/tracheoscopy	25	145	Alive	Alive	
7	7	Cynomolgus	9.3	5.0	0	0	132	Foetoscopic	NA	158	IUFD	Alive	Reversion of fetus during surgery
8	8	Cynomolgus	10.6	6.3	0	0	127	Foetoscopic/tracheoscopy	20	145	Perinatal death	Alive	No maceration of the new-born
9	3	Rhesus	4.0	7.1	1	0	144	Foetoscopic	NA	155	Alive	Alive	
10	6	Cynomolgus	12.0	5.3	1	0	124	Foetoscopic	NA	145	Perinatal death	Alive	Cephalic subcutaneous hematoma
11	1	Rhesus	16.0	7.7	2	0	132	Foetoscopic/tracheoscopy	25	163	Alive	Alive	
12	7	Cynomolgus	10.0	5.0	1	1	135	Foetoscopic/tracheoscopy	24	158	Alive	Alive	
13	9	Rhesus	10.8	9.1	6	2	138	Failure of fetoscopic access	NA	162	Alive	Alive	
14	10	Rhesus	3.9	6.1	0	0	136	Foetoscopic/tracheoscopy	13	153	Alive	Alive	
15	11	Rhesus	13.2	9.0	6	0	138	Foetoscopic/tracheoscopy/plug	11	163	Alive	Alive	
16	12	Rhesus	12.1	7.8	3	0	135	Foetoscopic/tracheoscopy	22	166	Alive	Alive	
17	6	Cynomolgus	12.7	5.3	2	1	139	Foetoscopic	NA	156	Alive	Alive	
18	13	Cynomolgus	8.8	5.7	2	1	134	Foetoscopic/tracheoscopy	13	203	IUFD	Alive	Post-term pregnancy
19	14	Cynomolgus	13.7	6.5	1	1	133	Foetoscopic/tracheoscopy	25	159	Perinatal death	Alive	<i>Staphylococcus aureus</i> in neonate lungs
20	15	Rhesus	12.5	7.3	1	0	132	Foetoscopic/tracheoscopy/plug	4	159	Alive	Alive	
21	16	Cynomolgus	13.2	7.7	2	0	136	Foetoscopic/tracheoscopy	28	162	Alive	Alive	
22	9	Rhesus	12.9	9.1	7	2	134	Foetoscopic/tracheoscopy/plug	6	143	Alive	Alive	

NA: not applicable; GA: gestational age; IUFD: intra-uterine fetal death.

Table 2. Comparison between the two non-human primate models for FETO.

	Rhesus monkeys <i>n</i> = 12	Cynomolgus monkeys <i>n</i> = 10
Age: years (mean ± SD)	10.6 ± 5.1	11.4 ± 1.7
Weight: kg (mean ± SD)	7.6 ± 1.0	5.8 ± 0.8
Previous fetal loss (n, %)	2 (17%)	4 (40%)
GA at surgery: days (mean ± SD)	136 (±4)	131 (±5)
Tracheoscopy (n, %)	9 (75%)	6 (60%)
Time to trachea: min (mean ± SD)	17 ± 10	22 ± 5
GA at birth (mean ± SD)	159 ± 8	156 ± 19
IUFD or perinatal death (n)	0 (0%)	6 (60%)
Maternal death (n)	0 (0%)	1 (10%)

SD: standard deviation; GA: gestational age; IUFD: intra-uterine fetal death.

Previous publications

Open fetal surgery with hysterotomy in primates was developed in the 1980s [21–23]. Several operations have been attempted: cystotomy, suprapubic catheterization, relief of urethral obstruction and perineal dissection [22]. Various topics have been studied: scar formation [24], brain development [25] and stem cell and bone transplantation [26–28].

Endoscopic access in fetal monkey model was evaluated in the 1990s [11–13]. However, this did not involve percutaneous endoscopic access, as it is deployed in most current human endoscopic fetal surgical procedures: mid-line abdominal incision and partial uterine mobilization from the abdominal cavity were performed before endoscopic access.

Experiments on congenital diaphragmatic hernia using the monkey model involved *in utero* repair of the diaphragm [29]. This technique has been abandoned because of failure to improve the newborn outcome and hysterotomy-induced maternal morbidity [30].

Three cases of FETO in baboons (*Papio* spp) have been recently reported [14]. Baboons have the same type of placentation than human but these monkeys have long dog-like muzzles that could be an issue for practicing FETO [10]. Beyond these cases, no data have been published on exclusively percutaneous endoscopic access for FETO using the fetal monkey model. Only the sheep model has been used for endoscopic FETO [8,9]. The monkey model more closely reflects human fetal anatomy, especially in respect of the fetal face, mouth, vocal cords and trachea.

Conclusions

Experimental FETO is feasible using a monkey model specially using the rhesus *Macaca*. This non-human primate model seems to be very similar to humans, which allows future studies related to the anatomy and consequences of the fetal transitory tracheal occlusion to the lung growth.

Acknowledgements

The authors thank Karl Storz for the laparoscopic unit.

Declaration of interest

This study was funded by the French Ministry of Health MIGAC research fund (Missions of General Interest and Assistance to Contracting) to the Fetal Medicine Department, Strasbourg, France.

References

- Butler N, Claireaux AE. Congenital diaphragmatic hernia as a cause of perinatal mortality. *Lancet* 1962;1:659–63.
- Gallot D, Boda C, Ughetto S, et al. Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a French registry-based study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:276–83.
- Khan PA, Cloutier M, Piedboeuf B. Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C:125–38.
- Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24:121–6.
- Deprest J, Nicolaides K, Done E, et al. Technical aspects of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2011;46:22–32.
- Jani JC, Nicolaides KH, Gratacos E, et al. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34:304–10.
- Ruano R, Yoshisaki CT, da Silva MM, et al. A randomized controlled trial of fetal endoscopic tracheal occlusion versus postnatal management of severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;39:20–7.
- Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, et al. Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg* 1997;32:1328–31.
- Evrard VA, Verbeken EA, Vandenberghe K, et al. Endoscopic In Utero Tracheal Plugging in the Fetal Lamb to Treat Congenital Diaphragmatic Hernia. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996;3:S11.
- Schlabritz-Loutsevitch NE, Lopez-Alvarenga JC, Comuzzie AG, et al. The prolonged effect of repeated maternal glucocorticoid exposure on the maternal and fetal leptin/insulin-like growth factor axis in *Papio* species. *Reprod Sci* 2009;16:308–19.
- van der Wildt B, Luks FI, Steegers EA, et al. Absence of electrical uterine activity after endoscopic access for fetal surgery in the rhesus monkey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;58:213–14.
- Feitz WF, Steegers EA, Aarnink RG, et al. Endoscopic intrauterine fetal therapy: a monkey model. *Urology* 1996;47:118–19.
- Feitz WF, Steegers EA, de Gier RP, et al. Feasibility of minimally invasive intrauterine fetal access in a monkey model. *J Urol* 1999;161:281–5.
- Mari G, Deprest J, Schenone M, et al. A novel translational model of percutaneous fetoscopic endoluminal tracheal occlusion – baboons (*Papio* spp.). *Fetal Diagn Ther* 2014;35:92–100.
- Abec CR, Mansfield K, Tardif S, Morris T. *Nonhuman Primates in Biomedical Research: Biology and Management*. London, UK: Academic Press; 2012.
- Hajivassiliou CA, Nelson SM, Dunkley PD, et al. Evolution of a percutaneous fetoscopic access system for single-port tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 2003;38:45–50 (discussion 45–50).
- Luks FI, Deprest JA, Gilchrist BF, et al. Access techniques in endoscopic fetal surgery. *Eur J Pediatr Surg* 1997;7:131–4.
- Ruano R, da Silva MM, Campos JA, et al. Fetal pulmonary response after fetoscopic tracheal occlusion for severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Obstet Gynecol* 2012;119:93–101.
- Ruano R, Peiro JL, da Silva MM, et al. Early fetoscopic tracheal occlusion for extremely severe pulmonary hypoplasia in isolated congenital diaphragmatic hernia: preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:70–6.
- Silk JSJ, Roberts J, Kusnitz J. Gestation length in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Int J Primatol* 1993;14:95–104.

21. Michejda M, Bacher J, Johnson D. Surgical approaches in fetal radiography and the study of skeletal age in *Macaca mulatta*. *J Med Primatol* 1980;9:50–61.
22. Harrison MR, Anderson J, Rosen MA, et al. Fetal surgery in the primate I. Anesthetic, surgical, and tocolytic management to maximize fetal-neonatal survival. *J Pediatr Surg* 1982;17:115–22.
23. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, et al. Fetal surgery in the primate. III. Maternal outcome after fetal surgery. *J Pediatr Surg* 1986;21:477–80.
24. Lorenz HP, Whitby DJ, Longaker MT, et al. Fetal wound healing. The ontogeny of scar formation in the non-human primate. *Ann Surg* 1993;217:391–6.
25. Michejda M, Bacher J. Functional and anatomic recovery in the monkey brain following excision of fetal encephalocele. *Pediatr Neurosci* 1985;12:90–5.
26. Cowan MJ, Chou SH, Tarantal AF. Tolerance induction post in utero stem cell transplantation. Ernst Schering Res Found Workshop 2001;145–71.
27. Mychaliska GB, Rice HE, Tarantal AF, et al. In utero hematopoietic stem cell transplants prolong survival of postnatal kidney transplantation in monkeys. *J Pediatr Surg* 1997;32:976–81.
28. Michejda M, Bacher J, Kuwabara T, et al. In utero allogeneic bone transplantation in primates: roentgenographic and histological observations. *Transplantation* 1981;32:96–100.
29. Esteve C, Toubas F, Gaudiche O, et al. Evaluation of 5 years of experimental in utero surgery for the repair of diaphragmatic hernia. *Ann Fr Anesth Reanim* 1992;11:193–200.
30. Harrison MR, Adzick NS, Bullard KM, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero VII: a prospective trial. *J Pediatr Surg* 1997;32:1637–42.

Computed Tomographic Study of the Pediatric Diaphragmatic Growth: Application to the Treatment of Congenital Diaphragmatic Hernia

Anne Schneider^{1,2} Meriam Koob³ Nicolas Sananes^{2,4} Bernard Senger² Joseph Hemmerlé²
Francois Becmeur¹

¹ Department of Pediatric Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, Alsace, France

² INSERM UMR 1121 Biomatériaux et Bioingénierie Tissulaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, Alsace, France

³ Department of Pediatric Radiology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, Alsace, France

⁴ Department of Fetal Medicine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, Alsace, France

Address for correspondence Anne Schneider, MD, Department of Pediatric Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, Alsace, France (e-mail: schneider.an@orange.fr).

Eur J Pediatr Surg 2017;27:177–180.

Abstract

Background The prosthesis commonly used for the treatment of congenital diaphragmatic hernia (CDH) lacks elasticity to replace the diaphragm's mechanical properties and does not follow the natural growth of the child treated.

Objective To determine the appropriate properties required for the prostheses, a CT study on healthy patients was conducted.

Methods Two methods of diaphragmatic surface analysis are assessed: the diaphragmatic surface is either estimated using surface 2D estimations (method 1), or calculated using length measures on thoracoabdominal CT scans from children (method 2). Patients are divided into two groups depending on their age: group 1: $n = 9$; median age: 2.0 months (0.1–9.5); group 2: $n = 9$; median age: 182.6 months (158.5–235.5). Growth factor between the two groups is calculated and the two methods are statistically compared.

Results The ratio group 2/group 1 of the diaphragmatic surfaces was 4.3 ± 0.2 on the left side and 4.0 ± 0.2 on the right side for method 1, and 5.1 ± 0.2 on the left side and 5.1 ± 0.3 on the right side for method 2. The difference in the median values between both methods is statistically significant for both the left and right sides ($p = 0.022$ and $p = 0.002$, respectively). Hence, the two methods cannot be used exchangeably.

Conclusion The treatment of CDH with large defect remains a challenge because of the high incidence of hernia recurrence probably due to prosthesis defect; thus it is important to estimate the diaphragmatic surface precisely. We aim to develop a prosthesis material that can be commonly used and found a mean diaphragmatic growth factor of approximately 4 to 5 from early childhood to adolescence.

Keywords

- congenital diaphragmatic hernia
- diaphragmatic growth
- pediatrics

received
January 5, 2016
accepted after revision
February 26, 2016
published online
April 11, 2016

© 2017 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1582242>.
ISSN 0939-7248.

Introduction

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a rare congenital disease, which requires neonatal surgical treatment. The diaphragmatic replacement is justified when more than half of the diaphragmatic dome is absent.^{1,2} The most frequently used prosthesis is composed of “expanded polytetrafluoroethylene” (ePTFE, Gore-Tex [W.L. Gore and Associates, Flagstaff, Arizona, United States]),³ which lacks elasticity to replace the diaphragm’s mechanical properties. Indeed, the prosthesis will be inserted at birth in a growing child and will lead to major traction on the anchoring stitches. Those can result in thoracic deformations, scoliosis,⁴ or hernia recurrence through prosthesis leakage (28–50%).^{1,5–8}

To design a prosthesis with better accuracy in shape and size to the anatomical features of the neonatal diaphragm, we aimed to determine the normal diaphragmatic growth from early childhood to adolescence, to define the required mechanical properties of prosthesis. To our best knowledge, there are no data published in the English literature regarding the diaphragmatic growth.⁹

Material and Methods

This retrospective monocentric study included patients with a median age of 2.0 months (0.1–9.5) (group 1, $n = 9$) and with a median age of 182.6 months (158.5–235.5) (group 2, $n = 9$). Those patients had previously undergone a thoracoabdominal computed tomographic (CT) scan for other reasons (traumatology, oncology follow-up, etc.) and did not have any diaphragmatic pathology or severe cardiac and/or pulmonary anomalies.

Two methods of evaluation of the surface of the diaphragm were followed and the results compared. The first method (method 1) consisted of a 2D surface estimation of each diaphragmatic dome using a cross-sectional imaging (**Fig. 1a, 1b**). The second method (method 2) considered the diaphragmatic dome as a part of an ellipsoid on a sagittal plane (**Fig. 2**) and consisted of a surface calculation using the formula $A = \pi b^2 + \pi a b \arcsin(e) / e$ where a is the half major axis of the ellipsoid, b is the half minor axis of the ellipsoid, and e the eccentricity defined by $\sqrt{a^2 - b^2} / a$.

Following the two methods, we obtained the surface area for each nine realizations of the left-part and nine realizations of the right-part diaphragmatic surface for both children and adolescents. Thereby we harvested eight samples of nine measurements each.

Statistical data analysis was performed using the Mann-Whitney rank sum test from the software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, United States).

Informed consent was obtained to perform this study from the patients and the study was authorized by the local ethical board.

Results

Combining the samples corresponding to the same method and the same side of the diaphragm, we computed $9 \times 9 = 81$ surface ratios that give the relative surface growth from child-

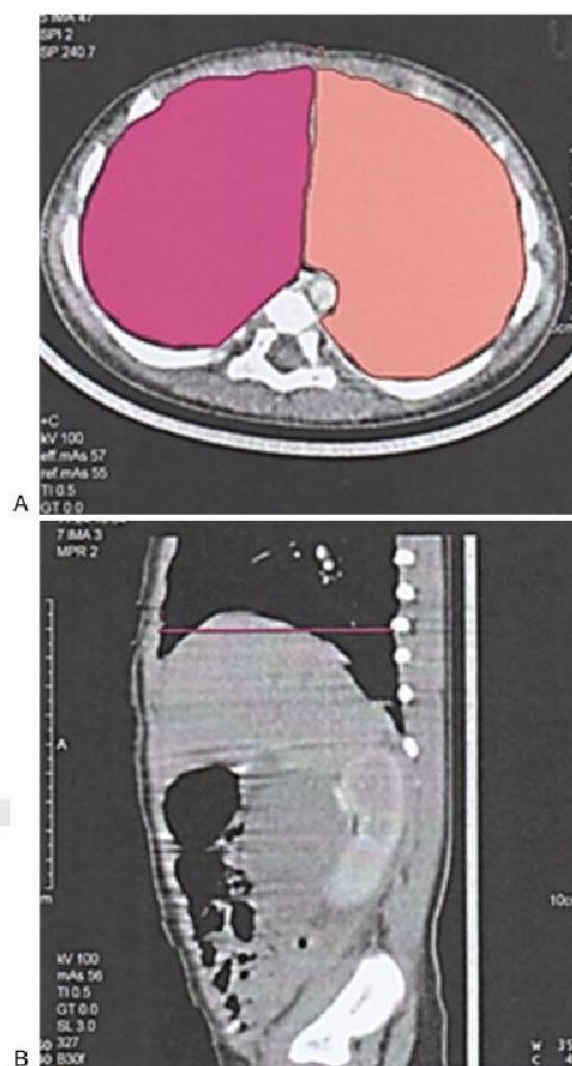


Fig. 1 (a, 1b) Method 1: 2D diaphragmatic surface estimation using a CT cross-sectional imaging; (1a) transverse section at the level of the diaphragmatic area; (1b) sagittal view.

hood to adolescence. The four distributions obtained this way are shown in **Fig. 3a, 3b**. In each panel, we compared method 1 with method 2. It is readily seen that method 2 (gray bars) leads to a distribution shifted toward the larger ratios if compared with the histogram derived from method 1 (black bars). More precisely, the ratio group 2/group 1 is for method 1 4.3 ± 0.3 on the left side and 4.0 ± 0.3 on the right side, and for method 2 5.1 ± 0.5 on the left side and 5.1 ± 0.5 on the right side (mean $\pm$ sem; see **Table 1**).

To compare the ratios from method 1 with those from method 2, we tried to perform the usual t -test. However, because the distributions are non-normal (see **Figs. 3a, 3b**), this test could not be applied. Instead, we performed the Mann-Whitney rank sum test. This test showed that the difference in the median values between the two methods (1L vs. 2L; 1R vs. 2R) is statistically significant for both the left and the right sides ($p = 0.022 < 0.05$ and $p = 0.002 < 0.05$, respectively). Thus,

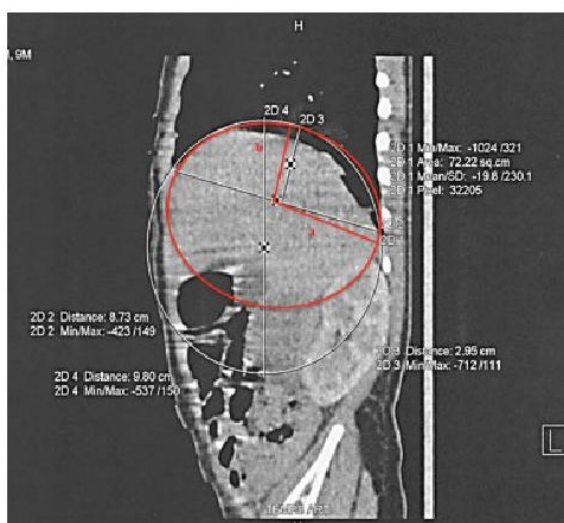


Fig. 2 Method 2: Diaphragmatic surface calculation. Sagittal view of the ellipsoid following the diaphragmatic dome on a CT scan with a = half major axis of the ellipsoid and b = half minor axis of the ellipsoid.

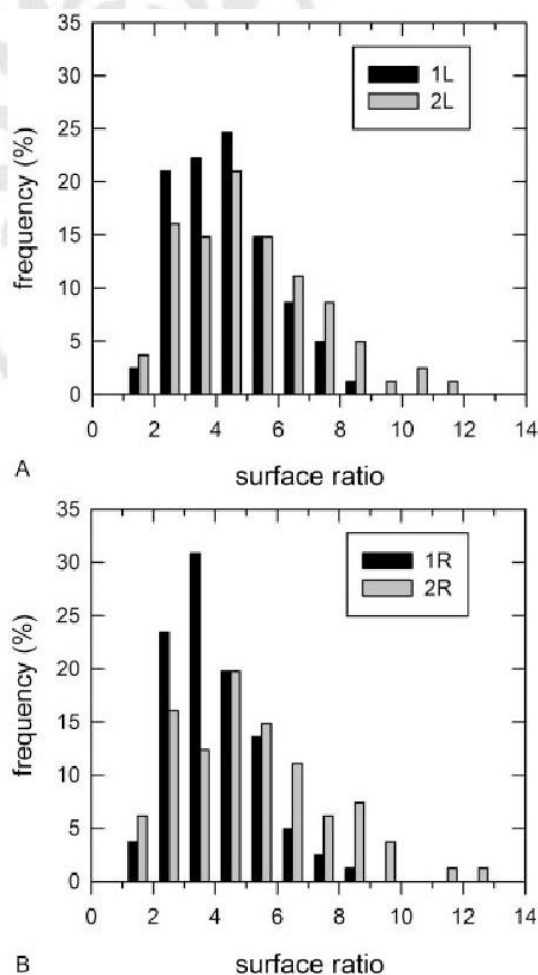


Fig. 3 Distribution of the group 2/group 1 ratio for left (3a) and right (3b) diaphragmatic domes. 1L, method 1 left side; 2L, method 2 left side; 1R, method 1 right side; 2R, method 2 right side.

Table 1 Characteristics of the distributions of the group 2/group 1 ratios

	Mean $\pm$ sem	Median	1st–3rd quartiles
1L	4.3 $\pm$ 0.2	4.1	3.0–5.3
2L	5.1 $\pm$ 0.2	4.7	3.5–6.4
1R	4.0 $\pm$ 0.2	3.9	2.9–4.7
2R	5.1 $\pm$ 0.3	4.8	3.3–6.4

Abbreviations: 1L, method 1 left side; 2L, method 2 left side; 1R, method 1 right side; 2R, method 2 right side; sem, standard error on the mean.

the two methods are assumed to be not equivalent when the risk of first kind is fixed to 0.05.

Discussion

Human diaphragmatic development has not been extensively studied. Precise determination of diaphragm geometry is difficult as the shapes are complex and the structure of the diaphragm is both anisotropic and variable from one part to another.⁹ To our knowledge, there are no published data or anatomical studies regarding normal diaphragmatic growth. The only published work mentioned that the diaphragmatic growth is proportional to the child's growth. In 2001 Rehan et al conducted an ultrasound study on 15 newborns and concluded that the diaphragmatic thickness is significantly associated with weight, height, and head circumference, but not to gestational age.⁹ One study, based on posteroanterior plain chest radiographic measures, revealed a significant association between age and diaphragmatic diameter in 89 children aged 9.0 ± 5.5 years.¹⁰

Our study aimed to define the normal diaphragmatic growth ratio from early childhood to adolescence. As the failure of the diaphragmatic prosthesis currently used for the treatment of CDH is due to its lack of elasticity required to replace the fluid movements of the diaphragm and the natural growth,¹¹ the present findings are of utmost interest to establish the specifications of an ideal prosthesis.

The present study reveals diaphragmatic surface growth factors ranging from 4.0 to 5.1 from early childhood to adolescence. Nevertheless, to be more accurate, our results should be related to weight, height, and sex at the time when the CT scan is performed, particularly for the group of adolescents. This information is often unavailable. Two methods of surface estimation were assessed: with method 1, it was easier to obtain the surface area thanks to the specific CT software, whereas method 2 required manual measures and time-consuming mathematical calculations. However, despite the practical problems it poses, in our opinion method 2 suits better to evaluate the diaphragmatic surface because it follows the anatomical landmarks. Statistical difference between methods 1 and 2 was more significant for the right side ($p = 0.002$), probably due to the presence of the leaver. Indeed, the right dome is placed higher than the left dome with a better evaluation using the 3D surface calculation than the 2D cross-sectional imaging.

Our study presents several problems. This is a biased sampling because our patients are a group having CT scans and are not randomly chosen and nor completely healthy. We could not include patients as their own controls, which could be a method more valid to follow changes in the diaphragm in single patients. However, patients who have had CT studies separated by several years are unfortunately rare. Both methods to estimate the diaphragmatic size are arbitrary, because this organ has a complex 3D structure. It is also problematic to estimate how a diaphragm grows sagittally, axially, coronally, and also how the muscular part grows in relation to the central tendon area as this part represents a sizeable and important portion of the normal diaphragm. The importance of this tendon area has been suggested in diaphragmatic tissue engineering methods.¹² However, the complex structure of the diaphragm is not accessible to actual imaging investigations with the current technologies.

Although the present methodology cannot be directly implemented in daily clinical practice for CDH patients, it provides original data of utmost importance for the design of appropriate biomaterials. First, we clearly demonstrate that the way of calculating area of the diaphragm can be improved, and we suggest a different calculation method to do so. Following this preliminary study, we aim to include in the future more patients using a diaphragmatic surface 3D modeling that provides more accurate measurements of the surface. Second, this paper discloses for the first time the precise growing factor of the diaphragm in relation to age.

Nevertheless, on behalf of these two points, we can say that our findings can obviously be implemented in the development of biomaterials that properly fit to the CDH defect, and thus are highly beneficial, although indirectly, in daily clinical practice for CDH patients.

References

- 1 Moss RL, Chen CM, Harrison MR. Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia: a long-term follow-up study. *J Pediatr Surg* 2001;36(1):152–154
- 2 Turner CG, Klein JD, Steigman SA, et al. Preclinical regulatory validation of an engineered diaphragmatic tendon made with amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg* 2011;46(1):57–61
- 3 Clark RH, Hardin WD Jr, Hirsch RB, et al. Current surgical management of congenital diaphragmatic hernia: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg* 1998;33(7):1004–1009
- 4 Chiu P, Hedrick HL. Postnatal management and long-term outcome for survivors with congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn* 2008;28(7):592–603
- 5 Grethel EJ, Cortes RA, Wagner AJ, et al. Prosthetic patches for congenital diaphragmatic hernia repair: Surgisis vs Gore-Tex. *J Pediatr Surg* 2006;41(1):29–33, discussion 29–33
- 6 Jancelewicz T, Vu LT, Keller RL, et al. Long-term surgical outcomes in congenital diaphragmatic hernia: observations from a single institution. *J Pediatr Surg* 2010;45(1):155–160, discussion 160
- 7 Laituri CA, Garey CL, Valusek PA, et al. Outcome of congenital diaphragmatic hernia repair depending on patch type. *Eur J Pediatr Surg* 2010;20(6):363–365
- 8 Mitchell IC, Garcia NM, Barber R, Ahmad N, Hicks BA, Fischer AC. Permacol: a potential biologic patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair. *J Pediatr Surg* 2008;43(12):2161–2164
- 9 Rehan VK, Laiprasert J, Wallach M, Rubin LP, McCool FD, McCool FD. Diaphragm dimensions of the healthy preterm infant. *Pediatrics* 2001;108(5):E91
- 10 Kamata S, Usui N, Sawai T, Nose K, Kamiyama M, Fukuzawa M. Radiographic changes in the diaphragm after repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008;43(12):2156–2160
- 11 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
- 12 Fauza DO. Tissue engineering in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2014;23(3):135–140

New insight in the biological integration of polytetrafluoroethylene from an explant used for diaphragm repair

Anne Schneider^{1,2}, Isabelle Talon^{1,2}, Eric Mathieu¹,
Pierre Schaaf¹, François Becmeur^{1,2} and Joseph Hemmerlé¹

Abstract

Congenital diaphragmatic hernia is a severe disease requiring diaphragm replacement mostly with expanded polytetrafluoroethylene. Unfortunately, the recurrence rate is high due to prosthesis failure with significant morbidity for the child. To provide a better understanding of the integration and possible failure processes of the biomaterial implanted in humans, we conducted electron microscopical and mechanical assessments on a prosthesis explant from a child with congenital diaphragmatic hernia presenting a recurrence. Our findings show a major penetration of connective tissue into the expanded polytetrafluoroethylene on the rough side, whereas the smooth side presents few tissue colonization. This penetration is more important in the central area (area A) with large collagen bundles and layers, in comparison to the peripheral areas without prosthesis failure (area B), where few extracellular matrix is produced. The connective tissue penetrates the prosthesis in depth. In contrast, the peripheral areas with prosthesis failure (area C) show very few cells and extracellular matrix, with an oriented organization in comparison to areas A and B. Obviously, the forces applied on the implanted material modulate the cellular behavior of the newly developed tissues. Atomic force microscopic measurements of the biomaterials' surfaces may explain some cellular behaviors according to areas with or without failure.

Keywords

Biomaterial, polytetrafluoroethylene, surgery, diaphragmatic hernia, electron microscopy

Introduction

The first clinical use of expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) is dated from 1972 and concerned vascular grafts. Its application was thereafter transferred to abdominal wall defects repair.¹ In pediatric surgery, e-PTFE is the most frequently used biomaterial for diaphragm replacement in congenital diaphragmatic hernia (CDH).² CDH is a congenital malformation defined as a diaphragmatic defect with intrathoracic herniation of abdominal viscera and pulmonary hypoplasia. It occurs in 1:2000 to 1:3000 births.³ e-PTFE is a strong and soft polymer with good sealant properties, but lacks elasticity necessary for the movements of the diaphragm due to respiration. More importantly, the implant cannot adapt to the dimensional changes of the natural diaphragm of a growing child.⁴ When an implant is used, hernia recurrence occurs in up to 50% of the cases within the first 3 years.⁴ The main

mechanism behind hernia recurrence is believed to be the fast growth rate of the diaphragm in infants and the important traction forces applied on the prosthesis.³

Actually, the ideal implant has yet to be developed and less is known about cell behavior with respect to the e-PTFE in this specific application. Our aim was to assess the biomaterial integration in a recurrent diaphragmatic hernia. As histological differences were noted between stretched and nonstretched areas, we performed atomic force microscopy (AFM) nanoindentation

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR_S 1121, Strasbourg, France

²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Chirurgie Pédiatrique, Strasbourg, France

Corresponding author:

Anne Schneider, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR_S 1121, 11 rue Humann, Strasbourg 67085, France.

Email: schneideran@orange.fr

to determine Young's moduli of nonimplanted e-PTFE and of the different areas of the studied explant.

Materials and methods

Explant material

A child was diagnosed at birth with left CDH Type D (following the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group classifications),⁵ and was treated at day 2 with diaphragmatic replacement using e-PTFE (Gore Tex DualMesh®, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ). This prosthesis presents two different surfaces: a macroporous rough side (Figure 1(a)) oriented to the thoracic cavity and a microporous smoother side (Figure 1(b)) oriented to the abdomen.⁶ The macroporous side is thought to favor cell attachment and ECM incorporation, whereas the microporous side is aimed to limit cell penetration to avoid intestinal adhesion.¹ Postoperative course was uneventful. At 10 months, the child presented failure to thrive and growth stagnation, and a postero-medial hernia recurrence was diagnosed. A surgical redo consisted in prosthesis deposition followed by a new e-PTFE prosthesis placement. Histological studies of the implanted prosthesis using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were conducted in three different areas: the center of the prosthesis (area A), the periphery without prosthesis failure (area B), and the periphery with prosthesis failure (area C).

Scanning electron microscopy

The e-PTFE samples with biological material were fixed in a 4% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde

solution buffered at pH 7.4 with sodium cacodylate 0.1 M. After two washes of 10 min in the same buffer, the samples were post-fixed in 1% osmic acid in a 0.1 M sodium cacodylate solution for 1 h. These chemicals were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). The fixed samples were dehydrated in a graded ethanol series for 10 min each, critical point dried (Balzers, Lichtenstein, Germany), and gold-palladium coated (Humer junior, Siemens, Karlsruhe, Germany).

SEM assessments were performed with a Quanta 400 ESEM (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) operating at an accelerating voltage of 10 kV.

Transmission electron microscopy

The e-PTFE samples with biological material were fixed in a 4% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde buffered at pH 7.4 with sodium cacodylate 0.1 M at pH 7.4. After three washes of 10 min in the same buffer, the samples were post fixed in 1% osmic acid in 0.1 M sodium cacodylate solution for 45 min. Chemicals were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Samples were then dehydrated in graded series of ethanol for 10 min each. The specimens were embedded in Spurr resin (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for its low viscosity. The composition of Spurr mix used (adapted for this study) was the following: 5.90 g of NSA (nonenyl succinic anhydride), 4.10 g of ERL4221 (cycloaliphatic epoxide resin), 1.59 g of DER 736 (diglycidyl ether of polypropylene-glycol), and 0.1 g DMAE (dimethylaminoethanol) as accelerator.

The e-PTFE samples were transferred successively in 1 vol. Spurr resin/2 vol. absolute ethanol for 30 min,

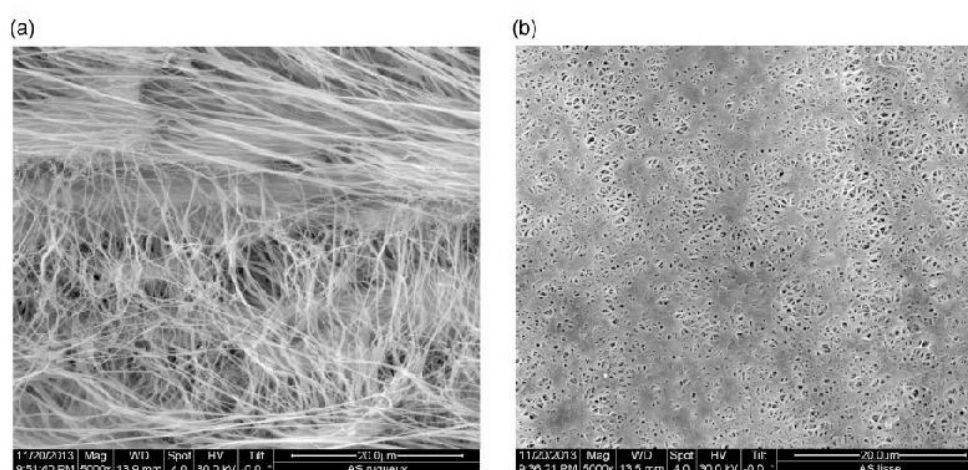


Figure 1. (a) Macroporous rough side of the e-PTFE prosthesis (Gore Tex DualMesh®, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ). SEM. (b) Microporous smoother side of the e-PTFE prosthesis (Gore Tex DualMesh®, W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ). SEM.

1 vol. Spurr resin/1 vol. absolute ethanol for 1 h and finally in 100% Spurr resin for 2 h. After transfer overnight in 100% Spurr resin, the e-PTFE samples were embedded in fresh resin and polymerized for 48 h at 60°C.

To localize cells, we performed semi-thin sections using an automatic ultra-microtome Reichert Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a diamond knife. To be able to perform ultra-thin sectioning, we reduced the e-PTFE as small as possible re-embedding it in the same resin as above. Ultra-thin sections were gently heated by putting the diamond knife on a warm plate (Lab-Line Instruments Inc., Ill, USA) at 45°C for 3 min to eliminate folds.

Ultrathin sections were collected on 100 mesh carbon-coated formvar-covered grids and stained with a 5% uranyl acetate solution (Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 20 min and with a 4% lead citrate solution for 10 min (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

TEM investigations were performed with a Philips EM 208 instrument (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) operating with an accelerating voltage of 70 kV. Images were recorded on Kodak SO163 films.

AFM measurements

AFM experiments were realized by using a Bioscope Catalyst apparatus (Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA USA). The silicon nitride cantilever with a spring constant of 0.25 N/m and a borosilicate particle having a radius of 5 µm attached to the tip (Novascan Technologies, Ames, IA USA) was operated with approach/withdraw velocities of 10.7 µm/s. The Young's moduli (E) of the probed specimens were calculated by fitting the contact part of the recorded

approach force curves to a standard Hertz model for a spherical indenter. Elasticity of the probed materials reflects their mechanical properties.

Results

SEM observations of the explants' surfaces give us a glimpse of the host response. On the rough side of the three observed areas we noted significant depositions of connective tissue onto the e-PTFE (Figure 2(a)), whereas the smooth side presented fewer cellular colonization (Figure 2(b)). For that reason we focused our attention particularly on the rough side of the explant, where the contrasting host responses respectively to the different areas were clearly recognizable.

TEM observations realized on transverse sections of the explant disclosed an infiltration of the biomaterial by extracellular matrix (ECM) synthesized by the surrounding cells (Figure 3(a) and (b)). This biological penetration appears to be more important in the center of the explant (area A) (Figure 3(a) and (b)) with the presence of large and dense collagen bundles (Figure 3(b) and (c)), in comparison to the peripheral region (area B) without failure where, however, the host cells produced fewer ECM (Figure 4(a) to (c)).

At the ultrastructural level, we generally observed a close contact between the e-PTFE material and the newly developed tissue at the implant surface, with ECM (Figure 3(a)) and collagen fibers penetrating into the porous biomaterial (Figure 3(b)). This close contact between the e-PTFE and the cellular material was evident at the implant's surface (Figure 4(a)) as well as within the porous implant (Figure 4(b)). TEM observations of transverse sections of the explant strongly suggest that cells of the host response are capable of penetrating deeply within the porous biomaterial, as it was the case in area A (Figure 5). On the other

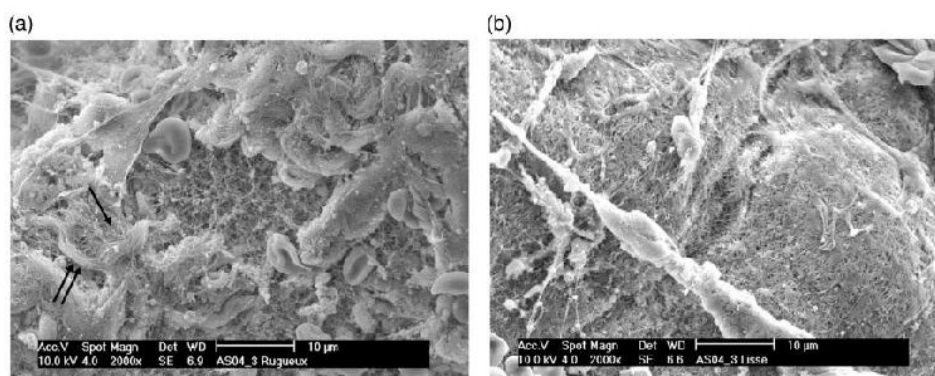


Figure 2. (a) Among the biological material covering the rough side of the central area (A) of the explant, one can note either fibrillar networks (arrow) or fiber bundles (double arrow). SEM. (b) Sparse biological material is visible on the smooth side of the central area (A) of the explant. SEM.

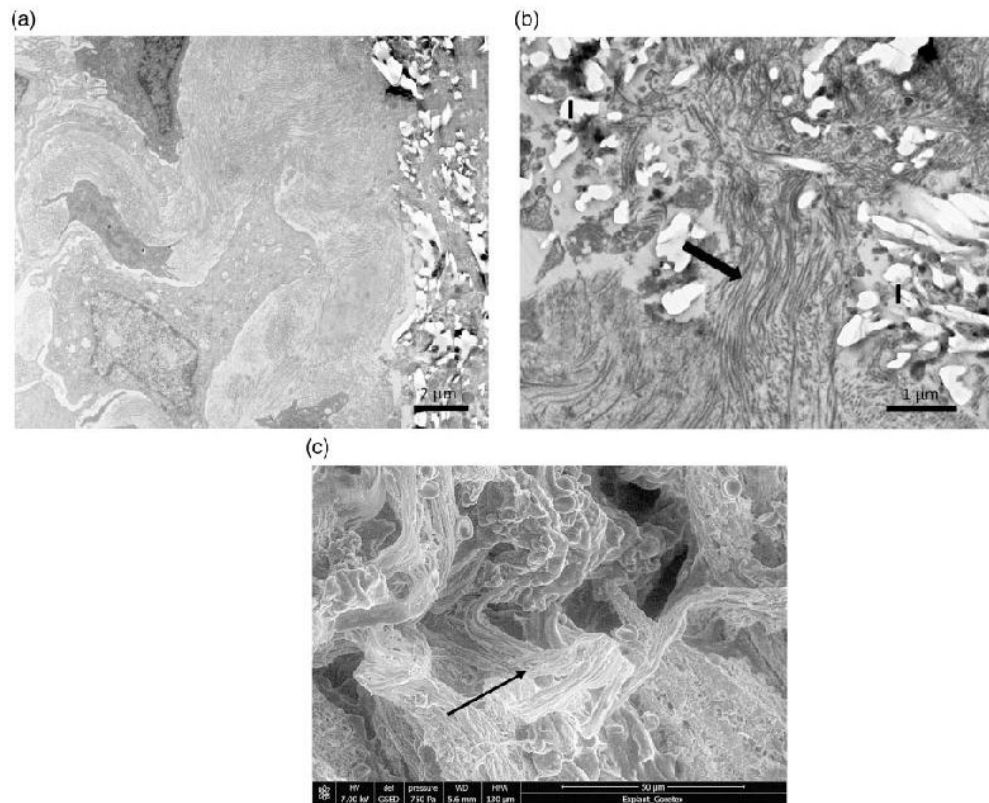


Figure 3. (a) Presence of cells within a well-developed extracellular matrix at the surface of the implant (I). Area A, TEM. (b) TEM micrograph clearly showing the penetration of collagen fibrils (arrow) within the biomaterial (I). Area A. (c) SEM micrograph exhibiting a collagen bundle (arrow) penetrating the e-PTFE material. Area A.

hand, in the peripheral area C, where the prosthesis attachment failed, we could observe, by SEM, only few cells scattered within a thin connective tissue layer. However, in this failure region, SEM micrographs disclosed highly ordered bundles of parallel oriented collagen fibrils (Figure 6).

Moreover, we noted a clear correlation between the electron microscopical observations (SEM and TEM) and the mechanical properties of the implant's surface measured by AFM nanoindentation. We determined the Young's moduli for nonimplanted e-PTFE as well as for the different areas investigated by electron microscopy: i.e. the central field (area A), the peripheral region without prosthesis failure (area B), and the peripheral region of the prosthesis with failure (area C). AFM measurements disclosed important changes of the elastic moduli of the implant surfaces before and after implantation (Table 1). Moreover, we observed significant differences of the microelastic properties when comparing areas with (area C) and without prosthesis failure (areas A and B). Quantitative measurements of the elasticity at the microscale level show that, immediately after implantation, the host cells are exposed to a rather stiff substrate (i.e. 295.0 ± 43.6 kPa), the e-PTFE

biomaterial. Nevertheless, it appears that after a given time, when cell-derived matrix was deposited onto the implant's surface, the host cells encounter a much softer environment, around 25 kPa, which is about ten times softer than what they feel on the raw e-PTFE material. More interestingly, we noticed an important difference of the Young's moduli between areas A and B, on the one hand, and area C on the other hand. Indeed, area C, corresponding to the periphery with prosthesis failure, appeared to be much stiffer (i.e. 172.3 ± 11.2 kPa) compared to both other assessed areas (A and B).

Discussion

First of all it must be pointed out that the ultrathin sectioning of the porous e-PTFE with the cellular material on its surface was a challenge, since the implant material remains very soft compared to the embedding resin. Indeed some authors performed TEM analysis on PTFE vascular grafts in animals, but they have never presented intact interfaces between PTFE and biological material.^{7,8} Even more recent microscopic investigations performed on PTFE sections emphasize the difficulty to show complete

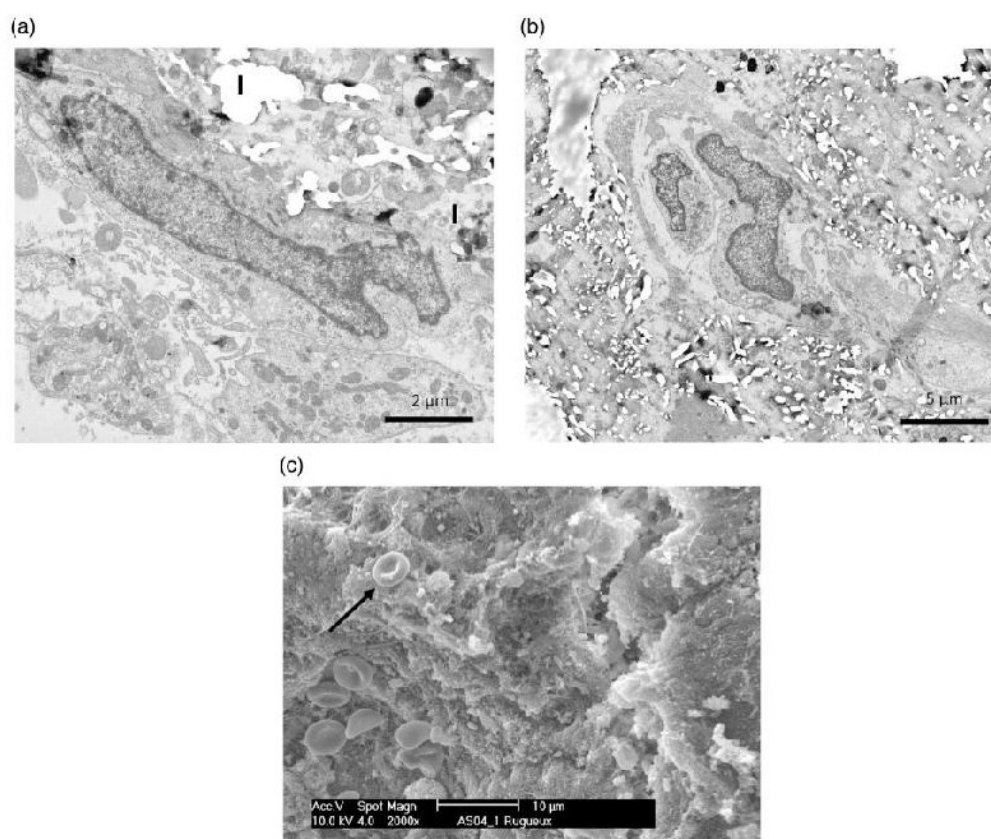


Figure 4. (a) TEM micrograph showing a direct contact between a cell and the e-PTFE porous structure (I). Area B. (b) In peripheral area B, extracellular matrix is scarce despite the presence of cells. TEM. (c) No collagen fibrils are evident within the biological material covering the e-PTFE surface of peripheral area B. Arrow = red blood cells. SEM.

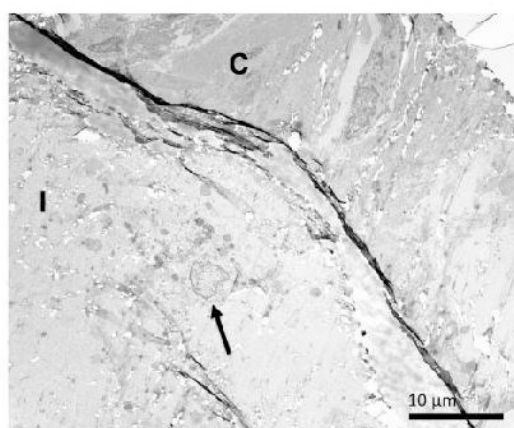


Figure 5. Sagittal ultra-thin section showing the interior of the prosthesis adjacent to the connective tissue developed at its surface. Cells are observed within the porous biomaterial (arrow). I = implant, C = cellular material, Area A, TEM.

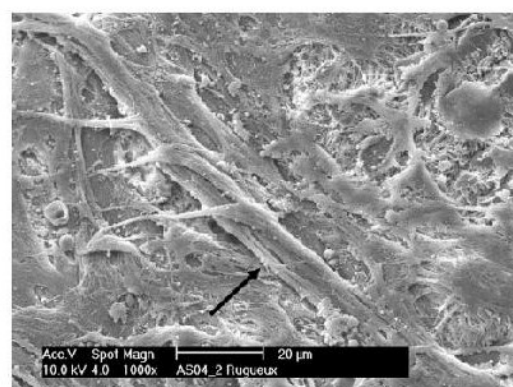


Figure 6. Evident structural modifications of the connective tissue under potential traction forces applied to peripheral area C. Collagen bundles (arrow) are oriented parallel to the stretching forces. Area C, SEM.

undamaged interfaces between the biomaterial and the surrounding biological tissues.⁹ To our best knowledge, the only TEM observations of a PTFE graft (for vascular indication in a rabbit model

or for oral implant treatment in humans) published today, do not give a clear picture of the biological process occurring at the surface and within implanted e-PTFE.^{10,11}

Table 1. Mean values ($\pm$ standard deviation) of three measures performed in three different areas on the nonimplanted e-PTFE and the three different areas of the studied explant (area A: center of the prosthesis, area B: periphery without prosthesis failure, area C: periphery with prosthesis failure).

	ePTFE	Area A	Area B	Area C
Young's modulus (kPa)	295.0 $\pm$ 43.6	22.9 $\pm$ 1.9	27.7 $\pm$ 6.6	172.3 $\pm$ 11.2

A previous histological study (optical microscopy) demonstrated that the implanted PTFE was infiltrated by fibroblastic tissue after 4 months in a dog model with complete tissue incorporation at 7 months.¹² Here, we demonstrate for the first time by using electron microscopy and from a human explant, that connective tissue penetrates the prosthesis in depth (Figure 5). The biological coating of the PTFE biomaterial is thought to decrease the risk of extrusion or displacement of the prosthesis, and may also decrease the risk of infection.¹² In 2000, Kimber et al.¹³ presented their results (optical microscopy) with PTFE prosthesis implanted in a lamb model: they showed that PTFE presented a strong foreign body macrophage giant cell response at the patch–tissue interface, with a striking separation between patch and tissue while sectioning; there was no cellular in-growth into the PTFE. They argued that this separation of the patch from the surroundings could lead to hernia recurrence. Nevertheless, with the double resin embedding technique used for our TEM investigations, we clearly show that there was no separation between e-PTFE and newly-formed tissue (Figures 3(a) and 4(a)), and that there was a major ingrowth in the e-PTFE interstices (Figures 3(b), 4(b), and 5).

If we consider area C, corresponding to the periphery with prosthesis failure, we observed only very few cells and sparse ECM at the biomaterial surface. Moreover, we noted a specific orientation of collagen fibers (Figure 6) in comparison to central area A (Figure 2(b)). This oriented organization of the ECM obviously results from the traction forces applied to peripheral area C. Figure 6 illustrates the effect on the newly developed ECM of the forces applied to the prosthesis. Despite the known important strength and durability of e-PTFE, the forces applied to the prosthesis can lead to hernia recurrence. Apart from this, it must be emphasized that the model diaphragmatic biomaterial has to ideally present two different surfaces as tissular adhesion has to be avoided at the abdominal side of the implant. The ideal material would have strength, flexibility to move with the native diaphragm, and would be reinforced or replaced by native tissue to follow child's growth to decrease chest wall

deformation and recurrence.⁴ Moreover, we could measure in a previous study that the implanted material should be elastic enough to be stretched 100% in length to adapt to the dimensional changes of the natural diaphragm of a growing child.¹⁴

Various alternatives to patch repair have been proposed to minimize hernia recurrence:¹⁵ thoracic or abdominal wall muscle flaps have been used before the time of prosthetic biomaterials, with the ability to grow with the child but also major surgical morbidities (abdominal wall deformation). Nowadays, regenerative medicine groups have achieved the creation of tissue-engineered diaphragms but these attempts remained at experimental levels. When a prosthetic diaphragmatic replacement is required, some authors have suggested the use of a cone-shaped patch, which seemed to decrease recurrence in a small series of patients with a 1-year follow-up.¹⁶ Over the last decades, several biomaterials have also been proposed to close diaphragmatic defects: synthetic nonabsorbable types (a composite mesh of PTFE associated with polypropylene, polymeric silicone for instance) or natural absorbable types (Surgisis®-porcine small intestinal submucosa or Permacol®-porcine dermal collagen for example), that demonstrated no advantages compared to PTFE.¹⁵

About the cellular host responses, some authors trying to develop diaphragmatic engineering suggested that a tendinous construct would be better than a muscular one because of potential inadequate innervation of the muscle.³ On this subject, our results undoubtedly emphasize both colonization and penetration of the e-PTFE implant with connective tissue. On the other hand, we failed on proving muscular cell migration on the studied explant. Of course, this could perhaps explain prosthesis failure and hernia recurrence.

Although AFM experiments were necessarily conducted on chemically fixed explants, they reflect the changes of the mechanical properties occurring at the biomaterial's surface after implantation. As it is generally accepted that mechanical properties of the substrate influence cell fate like morphogenesis, differentiation, and proliferation, it was clearly an opportunity to access to histological and mechanical data from e-PTFE implanted for 10 months in the human body. This correlative approach offers a more complete insight of the host response to the implanted biomaterial. It must be pointed out that the AFM measurements carried out in the present study on the raw biomaterial as well as on the three different areas of the explant were consistent with the electron microscopical observations.

The extracellular environments of implanted biomaterials are thought to play major roles in controlling cell responses, but little is known about the mechanical

properties of these heterogeneous three-dimensional newly-formed matrices. AFM measurements obtained from the raw biomaterial and the explant surfaces show that the host cells face quite different mechanical properties immediately after implantation and after a given time of implantation. At the beginning cells are exposed to a rather stiff substrate at the microscale level (i.e. 295.0 ± 43.6 kPa). With time, the PTFE is covered by extracellular matrix with variable pliability.¹⁷ About that, our AFM measurements demonstrate that hereafter cells encounter a much softer biological substrate (around 25 kPa) that they will sense and organize via integrin-mediated communication.¹⁸ It is of primary importance to note that the stiffness of the poorer ECM layer in the peripheral failure area C is quite different from the well-integrated areas. Cells growing in that detached area face a stiffer biological coating (i.e. 172.3 ± 11.2 kPa) that is likely to tune the local cellular behaviours. Obviously, mechanical properties assessments provide data that may explain some biological features of the host responses to implanted biomaterials.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Matthews BD, Pratt BL, Pollinger HS, et al. Assessment of adhesion formation to intra-abdominal polypropylene mesh and polytetrafluoroethylene mesh. *J Surg Res* 2003; 114: 126–132.
2. Moss L, Chen CM and Harrison MR. Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia: A long-term follow-up study. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 152–154.
3. Fauza DO. Tissue engineering in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2014; 23: 135–140.
4. Gasior AC and St Peter SD. A review of patch options in the repair of congenital diaphragm defects. *Pediatr Surg Int* 2012; 28: 327–333.
5. Harting MT and Lally KP. The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group registry update. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014; 19: 370–375.
6. Bellon JM, Contreras LA, Bujan J, et al. Experimental assay of a Dual Mesh PTFE prosthesis (non-porous on one side) in the repair of abdominal wall defects. *Biomaterials* 1996; 17: 2367–2372.
7. Clowes AW, Kirkman TR and Reidy MA. Mechanisms of arterial graft healing: Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. *Am J Pathol* 1986; 123: 220–230.
8. Mellander S, Fogelstrand P, Enocson K, et al. Healing of PTFE grafts in a pig model recruit neointimal cells from different sources and do not endothelialize. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 30: 63–70.
9. Bax DN, Wang Y, Li Z, et al. Binding of the cell adhesive protein tropoelastin to the PTFE through plasma immersion ion implantation treatment. *Biomaterials* 2011; 32: 5100–5111.
10. Watase M, Kambayashi J, Itoh T, et al. Ultrastructural analysis of pseudo-intimal hyperplasia of polytetrafluoroethylene prostheses implanted into the venous and arterial systems. *Eur J Vasc Surg* 1992; 6: 371–380.
11. Dahlin C, Simion M, Nanmark U, et al. Histological morphology of the e-PTFE-tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment. *Clin Oral Impl Res* 1998; 9: 100–106.
12. Newman BM, Jewett TC, Lewis A, et al. Prosthetic materials and muscle flaps in the repair of extensive diaphragmatic defects: An experimental study. *J Pediatr Surg* 1985; 20: 362–367.
13. Kimber CP, Dunkley MP, Haddock G, et al. Patch incorporation in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 120–123.
14. Schneider A, Koob M, Sananes N, et al. Computed tomographic study of the pediatric diaphragmatic growth: Application to the treatment of congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 2016. DOI: 10.1055/s-0036-1582242.
15. Zani A, Zani-Ruttenstock E and Pierro A. Advances in the surgical approach to congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014; 19: 364–369.
16. Loff S, Wirth H, Jester I, et al. 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: 1701–1705.
17. Burrridge K and Tsukita S. Editorial overview: Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 525–528.
18. Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 466–470.

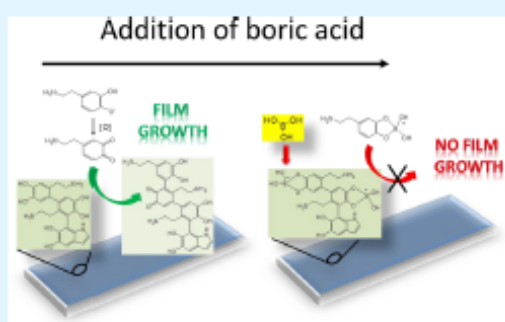
Boric Acid as an Efficient Agent for the Control of Polydopamine Self-Assembly and Surface Properties

Anne Schneider,[†] Joseph Hemmerlé,[†] Manon Allais,[†] Geoffrey Didierjean,[‡] Marc Michel,[‡] Marco d'Ischia,[§] and Vincent Ball^{*,†,||}[†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France[‡]Department of Materials Research and Technology (MRT), Luxembourg Institute for Science and Technology, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg[§]Department of Chemical Sciences, University of Naples, Federico II, Via Cintia 4, I-80126 Naples, Italy^{||}Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

Supporting Information

ABSTRACT: The deposition of polydopamine (PDA) films on surfaces, a versatile deposition method with respect to the nature of the used substrate, is unfortunately accompanied by deposition of insoluble precipitates in solution after a prolonged oxidation time of dopamine solutions. Therefore, there is evident interest to find methods able to stop the deposition of PDA on surfaces and to simultaneously control the self-assembly of PDA in solution to get stable colloidal aggregates. In addition to proposed methods relying on the use of polymers like poly(vinyl alcohol) and proteins like human serum albumin, we show herein that boric acid is an efficient adjuvant that is simultaneously able to stop the self-assembly of PDA in solution as well as on surfaces and to change the adhesive properties of the resulting PDA coatings.

KEYWORDS: polydopamine, boric acid, growth cessation



INTRODUCTION

The oxidation of dopamine and other catecholamines (norepinephrine, L-DOPA) allows the coating of surfaces of almost all known materials in a conformal fashion and emphasizes the extraordinary adhesion versatility of the obtained polydopamine material (PDA).^{1–3} This versatility relies on the presence of both of the catechols as well as quinones and amines in the obtained films and has been inspired by the abundance of L-DOPA and L-lysine in the proteins present in the adhesion plaque of mussels, the so-called Mefp proteins.⁴ Another advantage of PDA and of related materials is the possibility to be easily functionalized with other molecules, mainly nucleophiles,^{5,6} and with metal cations,^{1,7,8} which may undergo reduction into metal nanoparticles if their redox potential is well suited. All these functionalities of PDA make these films of the highest interest for many kinds of applications,^{9,10} e.g., in energy conversion processes,^{11–13} for the optimization of membrane filtration^{14,15} and for the design of biomaterials.¹⁶ Unfortunately, catecholamines are relatively expensive, and their oxidation not only produces a strongly adhesive coating at solid/liquid interfaces but also the formation of a heterogeneous precipitate in solution. This precipitate is insoluble and intractable like many other eumelanin-related materials and represents a huge loss in terms of material economy. The

formation of abundant precipitate can be limited if the dopamine oxidation process is performed on the surface of a conductive material under oxidant-free conditions.^{17–19} However, this is not always a viable option with those materials which, unlike metals, are not electrically conductive. The possibility to obtain PDA in the form of a stable suspension of particles was then inspired by the composite structure of eumelanin particles in the skin: they are surrounded by proteins.²⁰ Based on this observation, the oxidation of dopamine and other eumelanin precursors was undertaken in the presence of human serum albumin (HSA)²¹ and the mixture of proteins present in the egg yolk²² to yield a suspension of stable PDA particles. In the case of HSA, the hydrodynamic diameter of the composite PDA@protein particles is dependent on the protein/dopamine ratio used during the synthesis. Many other polymers, like poly(vinyl alcohol),²³ polyelectrolytes,²⁴ and even surfactants dissolved above their critical micellar concentration,²⁵ can be used to

Special Issue: 10 Years of Polydopamine: Current Status and Future Directions

Received: June 11, 2017

Accepted: September 5, 2017

control the size of PDA formation in solution. In many instances, the presence of such additives in solution also affects the deposition of PDA on surfaces. Under conditions where PDA@HSA nanoparticles reach the diameter of 30–40 nm, there is no detectable PDA film formation on the surface of the reaction vessels.²¹

In this framework, little attention has been directed so far to exploit small molecules capable of interacting strongly with the catechol moieties of dopamine as a means of controlling the size of PDA particles. To this aim, boric acid ($\text{B}(\text{OH})_3$) stands as an obvious and convenient candidate because of its ability to form strong complexes with catechol-containing substrates, including dopamine and other catecholamines, protecting them from spontaneous autooxidation at basic pH.²⁶ The equilibrium constants for the formation of catechol–boric acid complexes are well documented in the literature,^{27–30} and addition of boric acid to dopamine oxidation mixtures in solution may provide a rational tool to modulate the evolution of PDA aggregates in solution as well as to block PDA film deposition at solid–liquid interfaces at the desired thickness. The major aim of this article is to assess the usefulness of boric acid to finely tune PDA film formation and surface properties for technological applications. The effects of borate at high concentration on the adhesion properties of PDA will also be investigated based on the known ability of boronate derivatives to cross-link gels made from catechol-modified poly(ethylene glycols).³¹ Oxaborole-based polymers immobilized on surfaces can be used for the detection and quantification of dopamine in solution.³² The strong interactions between dopamine and borate derivatives may be useful both to control the deposition of PDA films and to modify their surface properties.

MATERIALS AND METHODS

Dopamine (ref H8502) and boric acid in the form of a 4% (w/v) solution (ref B6768) were purchased from Sigma-Aldrich and used without purification. The mother solution of boric acid had a concentration of 647 mM.

The deposition of PDA films and the simultaneous synthesis of PDA in solution was made by dissolving dopamine at $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (10.6 mM) in 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, Euromedex, France) buffer at pH = 8.5. The dissolution of dopamine corresponded to time $t = 0$ of the deposition/oxidation process. In most experiments, dopamine was oxidized by oxygen dissolved in water. All reactions were performed in open vessels with magnetic stirring to allow for a continuous supply of oxygen. Note that the solution agitation may influence the collision rate between the formed PDA aggregates and hence their aggregation and final size. It is however mandatory to shake the solution to ensure a continuous supply of oxygen. Otherwise, a concentration gradient in oxygen will develop which will markedly influence the thickness and roughness of the formed PDA films. To avoid such problems, we ensured a constant stirring rate of 300 rpm in identical beakers for a constant volume of the solution (100 mL).

Some experiments were performed in the presence of sodium acetate (ref 6268, Merck) buffer at 50 mM and at pH = 5.0 using 10 mM NaIO_4 (ref 311448, Sigma-Aldrich) as the oxidant as described in our previous publication.³³

The influence of the boric acid concentration on the evolution of dopamine solutions (initially at $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was investigated in two set of experiments.

- (i) Dopamine was dissolved in Tris buffer containing boric acid at various concentrations ranging from 1 to 430 mM. Immediately after dopamine dissolution, the solution was subjected to a cyclic voltammetry (CV) scan between -0.6 and $+1.0 \text{ V}$ vs the Ag/AgCl reference electrode at a potential scan rate of $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. A control experiment was performed with a pure dopamine solution at the same concentration without added boric acid.

Note that the pH of the boric acid solution decreased after dilution of the mother solution at 4% (w/v) and had to be readjusted to 8.5 before the dissolution of dopamine. These experiments were performed to investigate the interactions between boric acid and dopamine from an electrochemical point of view. The CV experiments were performed in a three-electrode configuration with an amorphous carbon working electrode (ref CHI 104, CHI Instruments, Austin, TX), an Ag/AgCl reference electrode (ref CHI 111), and a Pt wire auxiliary electrode (CHI 115). The potential difference between the working and the reference electrode was applied with a CHI 604B potentiostat. The carbon working electrode was polished with SiC paper and then with alumina slurries that were 1 and $0.1 \mu\text{m}$ in diameter before intensive sonication in water baths. The surface state of the amorphous carbon electrode was checked by performing a CV scan between -0.6 and $+1.0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl in the presence of Tris buffer containing 1 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (ref P9387, Sigma-Aldrich). The experiment was only continued if the oxidation peak potential and the reduction peak potential of $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ were separated by less than 80 mV, the theoretical value being 59 mV for a reversible one electron-transfer process.

The UV–vis spectra of the dopamine solutions were also measured 1 h after the dissolution of dopamine (Xenius spectrophotometer, Safas, France) to estimate the influence of added boric acid on the autooxidation of dopamine.

- (ii) Dopamine solutions ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the presence of 50 mM Tris buffer) were allowed to autoxidize for 3 h at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ with magnetic stirring (300 rpm). The hydrodynamic diameter of the aggregates present in solution was then measured by dynamic light scattering (Malvern Nano ZS) in a backscattering configuration. To that aim, the intensity autocorrelation function was analyzed with the Contin algorithm. The dopamine solution (already brown-black) was then diluted 3-fold either in Tris buffer (control experiment) or in a boric acid solution of variable concentration. In all cases, the pH was readjusted to 8.5, and the solution was shaken again. Dynamic light scattering experiments were performed at regular time intervals to estimate the change in the hydrodynamic diameter of the PDA aggregates in the presence and in the absence of boric acid. Visual inspection of the color change of the solutions was also performed.

The PDA films were deposited either on silicon wafers ((111) orientation from Siltronix, Archamps, France) or on silica-coated quartz crystals (Q5X303, QSense, Göteborg, Sweden). In addition, we also used 1 mm thick squares (4 cm^2) of expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) (Dualmesh) purchased from Gore and Associates (Flagstaff, AZ, U.S.A.). The silicon wafers cut in the form of rectangles (about $5 \times 1 \text{ cm}$) and the silica-coated quartz crystals were cleaned with a 2% (v/v) Hellmanex solution (Hellma GmbH, Weinheim, Germany) for 20 min, repeatedly rinsed with distilled water (Milli Q RO, $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), rinsed with 1 M HCl for 5 min, repeatedly rinsed with distilled water again, blown dry with filtered air, and finally plasma cleaned for 10 min (air plasma produced with a PDC-32G-2 plasma cleaner from Harrick Plasma, U.S.A.). The silica-coated quartz crystals were then mounted in the flow chamber of the QCM-E1 device (QSense, Göteborg, Sweden) and allowed to equilibrate in the presence of Tris buffer flowing at $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ at 25°C . As soon as the frequency drift became lower than $0.1 \text{ Hz} \cdot \text{min}^{-1}$ for all of the investigated overtones of the quartz crystal ($\nu = 1, 3, 5$, and 7 corresponding to resonance frequencies close to 5, 15, 25, and 35 MHz, respectively), dopamine was dissolved at $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the Tris buffer and injected into the flow chamber at the same flow rate of $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The deposition process of PDA was then recorded for 90 min, during which agitated dopamine solution was permanently injected over the quartz crystal from an external reaction beaker. This deposition process is fundamentally different from that performed in our previous investigation in that dopamine was dissolved in a closed vessel, in which the solution contained only a limited amount of dissolved oxygen.³⁴ In this case, the deposition process was arrested after a few minutes due to a limited amount of dissolved oxygen, and to continue the deposition process, a fresh dopamine solution had to be prepared and injected. In

the present investigation, an aerated dopamine solution was permanently injected in the QCM flow cell. After 90 min of PDA deposition, the flow was arrested for 10 min, during which the dopamine solution in the reaction vessel connected to the QCM deposition chamber was diluted 3-fold with either Tris buffer (control experiment) or with 4% (w/v) boric acid, corresponding to an effective concentration of 430 mM in boric acid. Note that when 2 volumes of 4% (w/v) boric acid were added to 1 volume of Tris buffer (with or without dopamine), the pH dropped to about 5.70. The pH was readjusted to 8.5 with concentrated sodium hydroxide before the boric acid solution and oxidized dopamine was injected again in the QCM chamber.

The deposition of PDA on freshly cleaned silicon slides was performed in an identical manner but without flow, the silicon slides being held vertically to avoid the deposition of PDA aggregates formed in solution. The initial deposition lasted over 3 h before 3-fold dilution with either Tris buffer or boric acid (the pH being again adjusted to 8.5). The thickness of the PDA films was measured by single-wavelength ellipsometry (PZ 2000, Horiba, France) as explained in detail elsewhere³⁴ (see also the Supporting Information (SI)).

The films deposited onto silicon after a total deposition time of 18 h (3 h in the presence of dopamine at 2 mg·mL⁻¹ and 15 h after 3-fold dilution) were rinsed with distilled water, blown dry, and characterized for their atomic composition by means of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). These experiments were carried out on a Kratos AXIS Ultra DLD instrument equipped with a hemispherical energy analyzer and a monochromatic Al K_α X-ray source ($h\nu = 1486.6$ eV) operated at 50 W. The pass energy was fixed at 160 eV with an analysis area of 300 × 700 μm and a takeoff angle of 0° with respect to the surface normal. An electron flood gun was used to compensate for the charge. All spectra were calibrated using the aliphatic contribution of the carbon 1s peak at 285.0 eV. No etching step was performed prior to the analyses. The XPS spectra were processed with CasaXPS, and a Shirley-type background was subtracted from the spectra.

The same deposition experiments were performed on e-PTFE sheets, and the dopamine solution at 2 mg·mL⁻¹ was diluted 3-fold in either Tris buffer or boric acid at 4% (w/v) and its pH was adjusted to 8.5.

The adhesion strength between Si₃N₄ tips, mounted on cantilevers with a spring constant of 0.067 N·m⁻¹, as characterized with the thermal noise method³⁵ and PDA films, were also undertaken. These experiments were performed with a Bioscope Catalyst AFM microscope (Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA, U.S.A.). The approach and retraction speeds were equal to 2 μm·s⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSION

At pH = 8.5, boric acid causes inhibition of the autoxidation of dopamine from oxygenated solutions with boric acid/dopamine molar ratios above 3. This was evidenced qualitatively by visual inspection of the dopamine solutions 1 h after their dissolution in Tris buffer containing a given concentration of added boric acid; the pH of these solutions was readjusted at pH = 8.5 with concentrated sodium hydroxide. From a quantitative point of view, the absorbance of the dopamine solutions at $\lambda = 500$ nm and after 1 h of autoxidation is plotted in Figure 1 as a function of the concentration of added boric acid. Some typical absorption spectra are given in Figure SI1 of the SI.

It appears that boric acid is able to inhibit the autoxidation of dopamine when added at a sufficiently high excess with respect to dopamine. It has to be noted here that phenylboronic acid plays a similar role in reducing the absorbance at 500 nm of dopamine solutions at pH 8.5 after 1 h of oxidation. We could however only explore boronate/dopamine ratios up to 7.7 owing to the limited solubility of phenylboronic acid in Tris buffer at pH 8.5 (data not shown).

The interactions between dopamine and boric acid are characterized by means of CV (Figure 2).

The oxidation peak potential of dopamine (at +0.22 V vs Ag/AgCl) is shifted to more anodic values of +0.65 and +0.81 V (vs

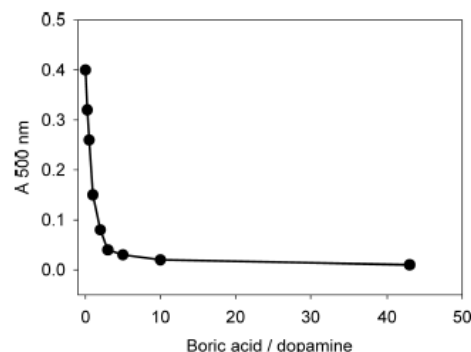


Figure 1. Evolution of the absorbance of dopamine solutions at 2 mg·mL⁻¹ (10.6 mM) at $\lambda = 500$ nm as a function of boric acid/dopamine ratio. The spectra (see some examples in Figure SI1 of the SI) were measured 1 h after mixing dopamine and boric acid, the pH being constant and equal to 8.5 in all cases.

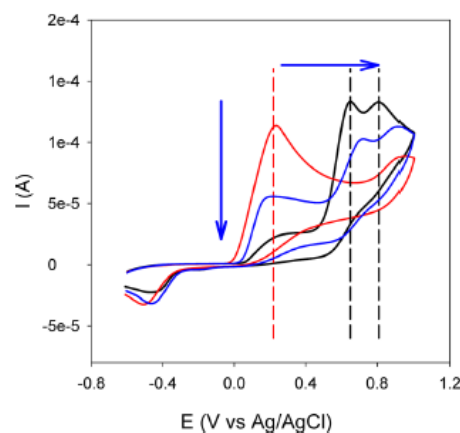


Figure 2. CV curves of dopamine at 3.5 mM in Tris buffer (red line), in Tris buffer containing 43.0 mM boric acid (blue line, pH readjusted to 8.5), and in Tris buffer containing 430 mM boric acid (black line, pH readjusted to 8.5). The potential scan rate was of 100 mV·s⁻¹ in all cases. The blue arrows indicate the qualitative evolution of the CV scans upon an increase in the boric acid concentration.

Ag/AgCl) when the concentration in boric acid is progressively increased to 430 mM. This observation clearly indicates that complex formation with boric acid stabilizes dopamine toward oxidation. Note that the oxidation of dopamine remains irreversible in the presence of boric acid and that after performing several CV scans in the same conditions, a PDA film impermeable to potassium hexacyanoferrate anions was deposited on the amorphous carbon electrode (Figure SI2 in the SI). However, in the absence of potential scans, even in the presence of dissolved oxygen at pH = 8.5, no PDA film is deposited on the amorphous carbon electrode as judged by comparing the CV in the presence of potassium hexacyanoferrate after immersion in the dopamine and 430 mM boric acid mixture (but without potential scans) and before immersion. This experiment confirms that boric acid prevents autoxidation of dopamine at pH 8.5.

However, when the same experiments are performed in the presence of sodium acetate buffer (50 mM at pH = 5.0) and 10 mM NaIO₄ as the oxidant, the autoxidation of dopamine is not affected by the presence of boric acid in the same concentration

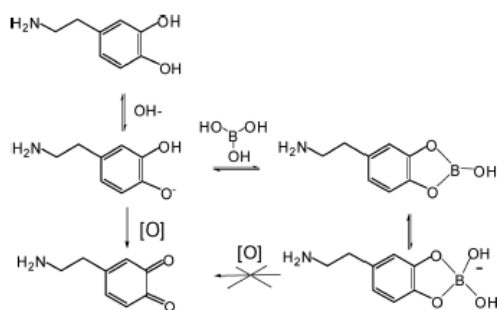
C

DOI: 10.1021/acsami.7b08356
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

range as used at pH = 8.5. This observation is consistent with the dependence of catechol–boric acid complexes on pH. Interaction of catechol derivatives with boric acid leads to a complex series of equilibria involving diverse types of complexes, including arylspiroboronate species, via initial coordination of one of the catechol oxygen atoms to the boron center followed by a proton transfer.³⁶ Thus, at acidic pH, e.g., 5.0, this interaction would not be efficient enough, while at pH = 8.5, close to the pK_a value of dopamine and boric acid ($pK_a = 9.23$), the formation of a boric acid–dopamine complex would be favored due to strong chelate formation with catecholate anions and would account for effective control of PDA aggregate growth.³⁰

Under reaction conditions characterized by an excess of boric acid, virtually all dopamine is likely to be in a complexed form, making its oxidation less facile (see Scheme 1).

Scheme 1. Interaction of Dopamine with Boric Acid and Inhibitory Effect of Complex Formation on Oxidation to Quinone and PDA Formation³⁶



In a next step, we investigated the effect of adding boric acid to a dopamine solution that had already undergone autooxidation at pH = 8.5 for 3 h. Dynamic light scattering experiments showed that the growth of PDA aggregates was stopped upon the addition of boric acid, whereas similar 3-fold dilution in Tris buffer without boric acid resulted in a slow increase in particle size until PDA precipitation (Figure 3A). Identical experiments were performed by varying the boric acid concentration while keeping the dopamine concentration constant. It appears that at least 30 mM boric acid is required to stop PDA aggregate growth after 3 h of oxidation at pH = 8.5 (Figure 3B).

The inset shows a picture of the diluted dopamine solution and of the dopamine solution with boric acid added at 430 mM after 5.5 h of oxidation in the presence of dissolved oxygen.

In subsequent experiments we addressed the issue of whether PDA film growth in the presence of dopamine solutions can be arrested by the addition of boric acid. This is an issue of both scientific and practical relevance, relating both to the chemical bases controlling PDA film growth and to the effects on surface properties. As in the experiments performed in solution, the dopamine solution was diluted 3-fold with a boric acid solution after a given deposition time of PDA in the absence of boric acid. For the purpose of this experiment, boric acid concentration was selected as the highest possible (430 mM) to ensure the maximum effect on PDA aggregation in solution. Figures 4 and 5, reporting the results of QCM and ellipsometry experiments, respectively, show that deposition of PDA films virtually stops when boric acid is added to the dopamine solution, whereas it continues, though at a slower rate, when the dopamine solution is diluted in a similar manner but with Tris buffer alone. The in situ and real time recording of the film deposition by QCM is

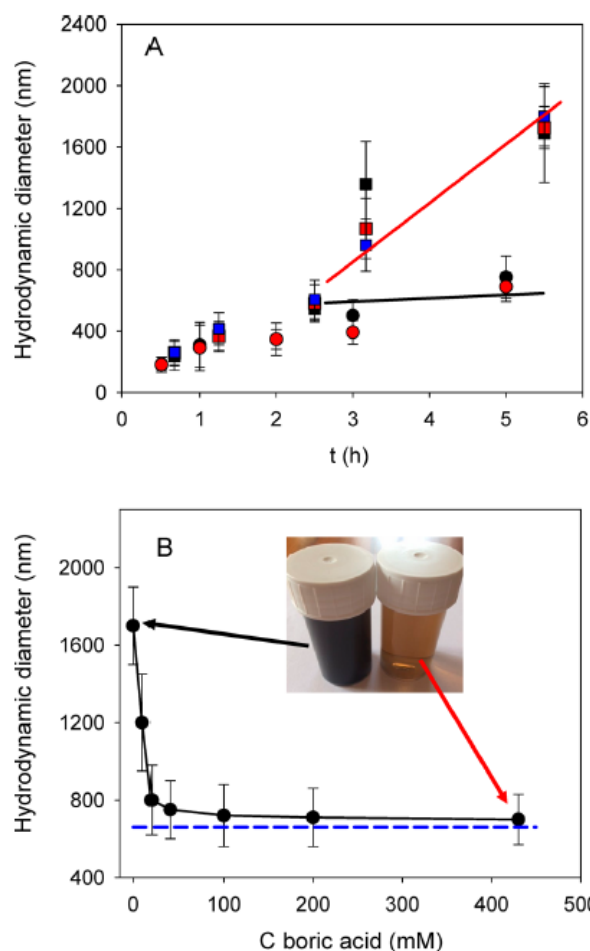


Figure 3. A: Time evolution of the hydrodynamic diameter of PDA particles being obtained after 3 h of oxidation before addition of a 2-fold volume of boric acid at 4% (w/v), leading to a final concentration of 430 mM in boric acid (black and red circles corresponding to two independent experiments and a black line to guide the eye) and a 2-fold volume of Tris buffer (black, red, and blue squares corresponding to three independent experiments and a red line to guide the eye). The concentration of boric acid in the dopamine/boric acid mixture was equal to 430 mM. B: Evolution of the hydrodynamic diameter of PDA particles obtained after 5.5 h of oxidation, where the 3 first hours of oxidation were performed without boric acid, as a function of the final concentration in boric acid (added after 3 h of oxidation). The blue horizontal dashed line corresponds to the average hydrodynamic diameter of PDA aggregates, (650 ± 50) nm, obtained after 3 h of autooxidation from dopamine solutions at 10.6 mM and at pH = 8.5.

particularly illustrative because it shows that the effect of boric acid addition is fast.

The inhibitory effect of boric acid on PDA deposition on silica and on silicon oxide in the presence of dopamine was demonstrated also on a qualitative basis on PTFE foils (Figure 6).

XPS analysis of the PDA films treated with 430 mM boric acid revealed some boron on their surface (Table 1) (See Figure SI3 in the SI). This finding is in agreement with the CV scans of Figure 2, namely that dopamine and PDA interact strongly with boric acid via complexation with catechol moieties. This interaction may account for the inhibitory effect of boric acid

D

DOI: 10.1021/acsami.7b08356
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

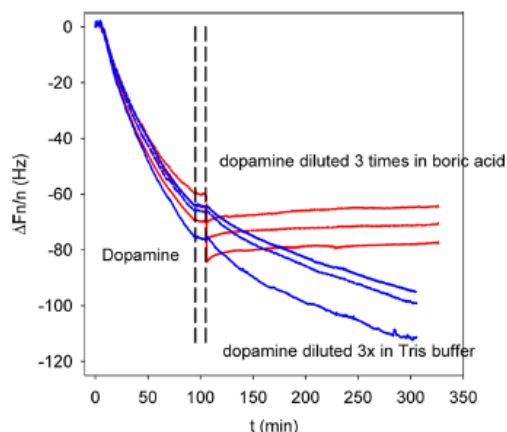


Figure 4. Deposition kinetics of a PDA film on silica-coated quartz crystal as monitored by means of QCM. After 1.5 h, the dopamine solution (initial concentration of 10.6 mM in 50 mM Tris buffer at pH = 8.5) was diluted 3-fold either in Tris buffer (blue lines) or in Tris buffer complemented with 4% (w/v) of boric acid to yield a final concentration of 430 mM in boric acid (red lines). The different lines correspond to the different overtones of the quartz crystal. The time interval between the two vertical dashed lines corresponds to the cessation of flow of the dopamine solution over the quartz crystal. During that time, the dopamine solution was diluted 3-fold.

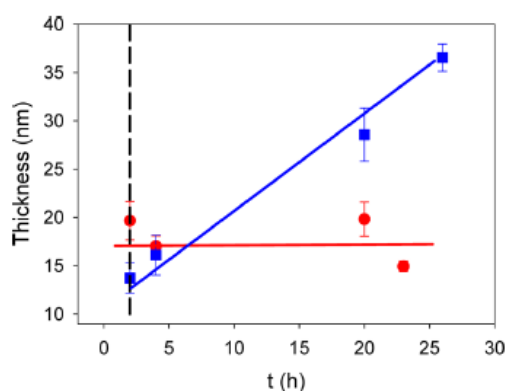


Figure 5. Evolution of the thickness of PDA films after 2 h of oxidation (dopamine at 10.6 mM, Tris buffer 50 mM, pH = 8.5) followed by a 3-fold dilution in either Tris buffer (blue squares and blue line to guide the eye) or in Tris buffer containing 4% (w/v) of boric acid (red circles and red line to guide the eye). The thickness was determined by single wavelength ellipsometry, and the error bars correspond to the standard deviation over five measurements performed on the same sample.

on PDA growth at two different levels: (a) the blockage of dopamine autooxidation and (b) the alteration of the PDA film surface by blocking catechol moieties with negatively charged groups. The latter mode would result in a sort of passivation of the PDA film surface, hindering both interaction and oxidative coupling with dopamine molecules in solution. In addition, the XPS survey spectrum of the PDA film grown for 4 h and subsequently exposed to diluted dopamine containing boric acid (430 mM for 14 h) still displays some small Si 2s and Si 2p signal that is absent on the survey spectrum of the film exposed to a diluted dopamine solution (without added boric acid). This is an additional proof that the film thickness continues to increase in the presence of diluted dopamine, whereas it remains much thinner when dopamine is diluted with boric acid. Indeed, the

analysis depth of XPS is of the order of a few nanometers. If the PDA films obtained after dilution with Tris, having an expected thickness of about 25 nm (ellipsometry data in Figure 5), are conformal and pinhole-free, the photoelectrons originating from the silicon substrate should not be detected anymore. However, ellipsometry and QCM show that the film thickness does not increase anymore after dilution of the dopamine solution with boric acid at 430 mM.

Finally, using atomic force microscopy (AFM), we investigate the adhesion of a Si_3N_4 tip to PDA films with boric acid, in the same manner as in the previously described experiments. The overview of the data are displayed in Figure 7B, whereas typical force–distance curves are given in Figure 7A. The data show clearly that when the dopamine solution is diluted with boric acid and, hence, when boric acid is present on the PDA surface (Table 1), the adhesion force histogram is shifted to lower adhesion values. Indeed, over 125 measurements, the PDA films obtained after 3-fold dilution in Tris buffer exhibit 38 adhesion events with an adhesion force higher than 100 pN, whereas the films obtained after 3-fold dilution of the dopamine solution with boric acid (final concentration of 430 mM) exhibit only 4 such events. Thus, it is argued that the presence of boric acid on PDA films (Table 1) markedly decreases adhesiveness with respect to Si_3N_4 tips. This effect is evidently the consequence of the generation of ionic and hydrophilic borate residues preventing effective interaction with the probe tip.

Contrarily to our data, when 3-acrylamidophenylboronate is immobilized on a surface, the adhesion energy with dopamine-methacrylamide is increased with respect to the absence of the boron-containing species, showing that the formation of catechol–boronate complexes can also be used to increase adhesion between surfaces.³⁷

CONCLUSIONS

The addition of boric acid to dopamine solutions in basic conditions allows the cessation of the autooxidation of dopamine into PDA both in solution and at interfaces, provided the boric acid/dopamine ratio is higher than 3. This offers the double advantage of producing a stable suspension of PDA (instead of an insoluble precipitate in the absence of boric acid) and a PDA film with boric acid–catechol complexes at the solid/solution interface. Such films are less adhesive to Si_3N_4 than pristine PDA.

The addition of boric acid in dopamine solutions after a time sufficient to reach conformal film coverage (about 20 nm of film thickness impermeable to potassium hexacyanoferrate is reached after 3 h of oxidation) will allow to us make use of the large excess of undeposited PDA, which would otherwise precipitate out of the solution upon prolonged oxidation times, as a stable PDA suspension. Indeed, when the oxidation of dopamine is continued for durations longer than 3–5 h, the film thickness increases from about 20 nm, an already conformal film as shown by cyclic voltammetry, to about 40–45 nm, implying 2× more material taken away from the solution. However, in all cases, in the configuration of our experiments (beaker of 100 mL) the fraction of the initial dopamine on the surface of the beaker is very small, less than 1% (see SI) with respect to the molar fraction of dopamine present in the aggregates. It is then of the highest interest to take advantage of these aggregates, which is only possible if their size evolution is quenched to yield a stable suspension. We showed herein that boric acid may allow us to reach this goal at a boric acid/dopamine ratio higher than about 10.

E

DOI: 10.1021/acsami.7b08356
ACS Appl. Mater. Interfaces XXXX, XXX, XXX–XXX

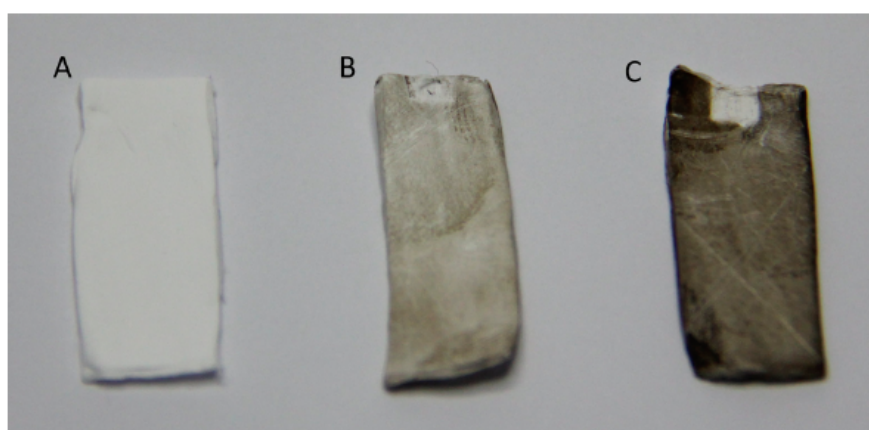


Figure 6. PDA deposition on PTFE foils. A: pristine PTFE foil; B: PTFE foil coated with PDA for 4 h (10.6 mM dopamine in the presence of 50 mM Tris buffer) and then diluted in Tris buffer containing 4% (w/v) boric acid (18 h exposure); C: PTFE foil coated with PDA for 4 h (10.6 mM dopamine in the presence of 50 mM Tris buffer) and then diluted in Tris buffer (18 h exposure).

Table 1. Atomic Composition of the Extreme Surface of PDA Films Grown for 18 h in the Presence of Dopamine at pH = 8.5[†]

	B	C	Ca	F	N	Na	O	Si
a	2.5%	72.5%	0.9%	0.4%	6.8%	1.0%	15.0%	0.9%
b	0.1%	72.9%	0.3%	0.0%	7.4%	0.4%	18.9%	0.0%

[†]Conditions a and b correspond to a 3-fold dilution in boric acid and to a 3-fold dilution in Tris buffer after 4 h of autoxidation, respectively.

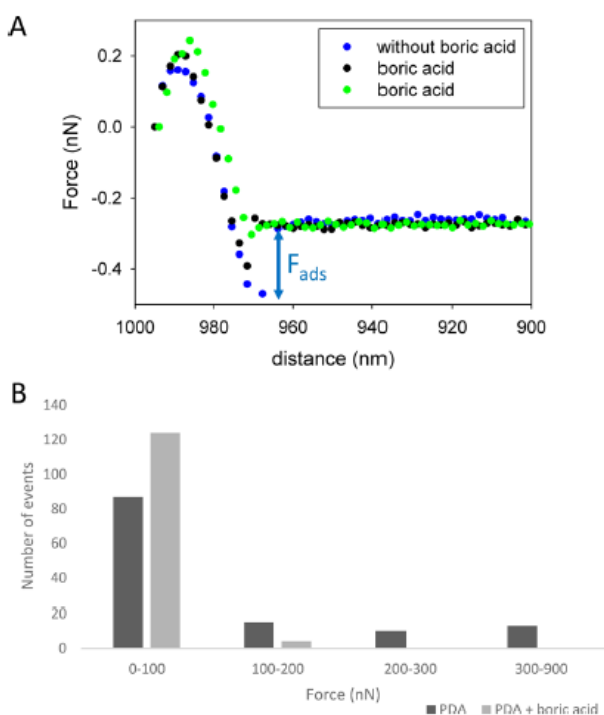


Figure 7. A: Typical force–distance curves measured upon retracting the AFM tip from PDA-coated surfaces. The glass slides were coated with PDA for 4 h before 3-fold dilution of the solution with Tris buffer (blue circle) and with Tris buffer containing 430 mM boric acid (black circle, green circle). The reaction was then run over 14 h before rinsing with distilled water, drying, and force measurements. B: Histogram of the adhesion forces between an Si₃N₄ tip and a PDA film after 4 h of deposition from a 10.6 mM dopamine solution at pH 8.5 followed by a 3-fold dilution in Tris buffer (black data) and in boric acid at 430 mM (gray data) in the same conditions as explained under A.

The obtained stable PDA-based suspensions will be used as inks for the impression of PDA-based patterns in future applications

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.7b08356.

Additional experimental details; estimation of the molar fraction of dopamine present in the films and in the solution after 24 h of oxidation at pH 8.5; UV–vis spectra of dopamine solutions, 10.6 mM at pH = 8.5 in the absence and in the presence of boric acid at a concentration of 43 mM; CV curves of dopamine (10.6 mM) solutions containing 430 mM boric acid on an amorphous carbon working electrode, XPS survey scans (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vball@unistra.fr

ORCID

Marco d'Ischia: 0000-0002-7184-0029

Vincent Ball: 0000-0002-7432-4222

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- (2) Hong, S.; Kim, J.; Na, Y. S.; Park, J.; Kim, S.; Singha, K.; Im, G.-I.; Han, D.-K.; Kim, W. J.; Lee, H. Poly(norepinephrine): Ultrasoft Material-Independent Surface Chemistry and Nanodepot for Nitric Oxide. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 9187–9191.

- (3) Della Vecchia, N. F.; Luchini, A.; Napolitano, A.; D'Errico, G.; Vitiello, G.; Szekely, N.; d'Ischia, M.; Paduano, L. Tris Buffer Modulates Polydopamine Growth, Aggregation, and Paramagnetic Properties. *Langmuir* **2014**, *30*, 9811–9818.
- (4) Brubaker, C. E.; Messersmith, P. B. The Present and Future of Biologically Inspired Adhesive Interfaces and Materials. *Langmuir* **2012**, *28*, 2200–2205.
- (5) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 431–434.
- (6) Ham, H. O.; Liu, Z. Q.; Lau, K. H. A.; Lee, H.; Messersmith, P. B. Facile DNA Immobilization on Surfaces through a Catecholamine Polymer. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 732–736.
- (7) Xu, H.; Shi, X.; Ma, H.; Lv, Y.; Zhang, L.; Mao, Z. The Preparation and Antibacterial Effects of Dopa-Cotton/AgNPs. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 6799–6803.
- (8) Ball, V.; Nguyen, I.; Haupt, M.; Oehr, C.; Arnoult, C.; Toniazio, V.; Ruch, D. The Reduction of Ag⁺ in Metallic Silver on Pseudomelanin Films Allows for Antibacterial Activity but Does not Imply Unpaired Electrons. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 359–365.
- (9) 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*, 5057–5115.
- (10) Ball, V.; Del Frani, D.; Michel, M.; Buehler, M. J.; Toniazio, V.; Singh, M. K.; Gracio, J.; Ruch, D. Deposition Mechanism and Properties of Thin Polydopamine Films for High Added Value Applications in Surface Science at the Nanoscale. *Bionanoscience* **2012**, *2*, 16–34.
- (11) Zhou, L.; Zong, Y.; Liu, Z.; Yu, A. A Polydopamine Coating Ultralight Graphene Matrix as a Highly Effective Polysulfide Adsorbent for High Energy Li-S Batteries. *Renewable Energy* **2016**, *96*, 333–340.
- (12) Kim, Y. J.; Wu, W.; Chun, S.-E.; Whitacre, J. F.; Bettinger, C. J. Biologically derived melanin electrodes in aqueous sodium-ion energy storage devices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 20912–20917.
- (13) Long, H.; Del Frani, D.; Martin, A.; Didierjean, J.; Ball, V.; Michel, M.; Ibn El Ahrach, H. Ibn El Ahrach. Polydopamine as a promising candidate for the design of high performance and corrosion tolerant polymer electrolyte fuel cell electrodes. *J. Power Sources* **2016**, *307*, 569–577.
- (14) Xi, Z.-Y.; Xu, Y.-Y.; Zhu, L.-P.; Wang, Y.; Zhu, B.-K. 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.
- (15) Yang, H.-C.; Luo, J.; Lv, Y.; Shen, P.; Xu, Z.-K. Surface Engineering of Polymer Membranes via Mussel-Inspired Chemistry. *J. Membr. Sci.* **2015**, *483*, 42–59.
- (16) Lynge, M. E.; van der Westen, R.; Postma, A.; Stadler, B. Polydopamine—a Nature-Inspired Polymer Coating for Biomedical Science. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4916–4928.
- (17) Li, Y.; Liu, M.; Xiang, C.; Xie, Q.; Yao, S. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Study on Growth and Property of the Polymer deposit at Gold Electrodes During Oxidation of Dopamine in Aqueous Solutions. *Thin Solid Films* **2006**, *497*, 270–278.
- (18) Kim, I. G.; Nam, H. J.; Ahn, H. J.; Jung, D.-Y. Electrochemical Growth of Synthetic Melanin Thin Films by Constant Potential Methods. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2954–2959.
- (19) Bernsmann, F.; Voegel, J.-C.; Ball, V. Different synthesis methods allow to tune the permeability and permselectivity of dopamine-melanin films to electrochemical probes. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3914–3919.
- (20) Moses, D. N.; Mattoni, M. A.; Slack, N. L.; Waite, J. H.; Zok, F. W. Role of Melanin in Mechanical Properties of Glycera Jaws. *Acta Biomater.* **2006**, *2*, 521–530.
- (21) Chassepot, A.; Ball, V. Human Serum Albumin and Other Proteins as Templating Agents for the Synthesis of Nanosized Dopamine-Eumelanin. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *414*, 97–102.
- (22) Della Vecchia, N. F.; Cerruti, P.; Gentile, G.; Errico, M. E.; Ambrogio, V.; D'Errico, G.; Longobardi, S.; Napolitano, A.; Paduano, L.; Carfagna, C.; d'Ischia, M. Artificial Biomelanin: Highly Light-Absorbing Nano-Sized Eumelanin by Biomimetic Synthesis in Chicken Egg White. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3811–3816.
- (23) Arzillo, M.; Mangiapia, G.; Pezzella, A.; Heenan, R. K.; Radulescu, A.; Paduano, L.; d'Ischia, M. Eumelanin Buildup on the Nanoscale: Aggregate Growth/assembly and Visible Absorption Development in Biomimetic 5,6-Dihydroxyindole Polymerisation. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2379–2390.
- (24) Mateescu, M.; Metz-Boutigue, M.-H.; Bertani, P.; Ball, V. Polyelectrolytes to Produce Nanosized Polydopamine. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *469*, 184–190.
- (25) Ponzio, F.; Bertani, P.; Ball, V. Role of surfactants in the control of dopamine-eumelanin particle size and in the inhibition of film deposition at solid-liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *431*, 176–179.
- (26) Herlinger, E.; Jameson, R. F.; Linert, W. Spontaneous Autoxidation of Dopamine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 259–263.
- (27) Pizer, R.; Babcock, L. Mechanism of the Complexation of Boron Acids with Catechol and Substituted Catechols. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 1677–1681.
- (28) Waite, J. H. Determination of (catecholato)borate Complexes Using Difference Spectrophotometry. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1935–1939.
- (29) Bell, C. F.; Gallagher, B. C.; Lott, K. A. K.; Short, E. L.; Walton, L. Boric Acid Complexes of Phenolic Acids. *Polyhedron* **1991**, *10*, 613–618.
- (30) Rafiee, M.; Nematollahi, D. Electrochemical Study of Catechol-Boric Acid Complexes. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 2751–2756.
- (31) He, L.; Fullenkamp, D. E.; Rivera, J. G.; Messersmith, P. B. pH Responsive Self-Healing Hydrogels Formed by Boronate–Catechol Complexation. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7497–7499.
- (32) Jiang, K.; Wang, Y.; Thakur, G.; Kotsuchibashi, Y.; Naicker, S.; Narain, R.; Thundat, T. Rapid and Highly Sensitive Detection of Dopamine Using Conjugated Oxaborole-Based Polymer and Glycopolymer Systems. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 15225–15231.
- (33) Ponzio, F.; Barthes, J.; Bour, J.; Michel, M.; Bertani, P.; Hemmerlé, J.; d'Ischia, M.; Ball, V. Oxidant Control of Polydopamine Surface Chemistry in Acids: a Mechanism-Based Entry to Superhydrophilic-Superoleophobic Coatings. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 4697–4705.
- (34) Bernsmann, F.; Ponche, A.; Ringwald, C.; Hemmerlé, J.; Raya, J.; Bechinger, B.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P.; Ball, V. Characterization of Dopamine-Melanin Growth on Silicon-Oxide. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 8234–8242.
- (35) Levy, R.; Maaloum, M. Measuring the Spring Constant of Atomic Force Microscope Cantilevers: Thermal Fluctuations and other methods. *Nanotechnology* **2002**, *13*, 33–37.
- (36) Vogels, C. M.; Westcott, S. A. Arylspiroboronate Esters: From Lithium Batteries to Wood Preservatives to Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1446–1458.
- (37) Narkar, A. R.; Barker, B.; Clisch, M.; Jiang, J.; Lee, B. P. pH Responsive and Oxidation Resistant Wet Adhesive based on Reversible Catechol–Boronate Complexation. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 5432–5439.

Polydopamine Films from the Forgotten Air/Water Interface

Florian Ponzio,[†] Payam Payamyar,[‡] Anne Schneider,[†] Mathias Winterhalter,[§] Jérôme Bour,^{||} Frédéric Addiego,^{||} Marie-Pierre Krafft,[⊥] Joseph Hemmerle,[†] and Vincent Ball^{*,†,‡,#}[†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France[‡]Department of Materials, Laboratory of Polymer Chemistry, ETH Zürich, Vladimir-Prelog-Weg 5, 8093 Zürich, Switzerland[§]School of Science and Engineering, Campus Ring, Molecular Life Science Research Center, Jacobs University Bremen, D-28759 Bremen, Germany^{||}Centre de Recherche Public Henri Tudor, Advanced Materials and Structures, ZAE Robert Steichen, 5 rue Bommel, L4940 Hautcharage, Luxembourg[⊥]Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Charles Sadron, Unité Propre 22, 23 Rue du Loess, 67034 Strasbourg Cedex 2, France[#]Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

Supporting Information

ABSTRACT: The formation of polydopamine under mild oxidation conditions from dopamine solutions with mechanical agitation leads to the formation of films that can functionalize all kinds of materials. In the absence of stirring of the solution, we report the formation of polydopamine films at the air/water interface (PDA A/W) and suggest that it arises from an homogeneous nucleation process. These films grow two times faster than in solution and can be deposited on hydrophilic or hydrophobic substrates by the Langmuir–Schaeffer technique. Thanks to this new method, porous and hydrophobic materials like polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes can be completely covered with a 35 nm thick PDA A/W film after only 3 h of reaction. Finally the oxidation of a monomer followed by a polymerization in water is not exclusive to polyaniline since we also transferred polyaniline functional films from the air/water interface to solid substrates. These findings suggest that self-assembly from a solution containing hydrophilic monomers undergoing a chemical transformation (here oxidation and oligomerization) could be a general method to produce films at the liquid/air interface.

SECTION: Biomaterials, Surfactants, and Membranes



Polydopamine films have become an efficient and versatile one pot functionalization method in the past few years since it has been shown that it is possible to coat almost all known materials by immersing them in oxygenated and slightly basic dopamine containing solutions.¹ Polydopamine is presumed to be a material similar to eumelanin.² However, its exact structure is still unknown and new analytical methods should be used to elucidate its structure-properties relationship. Recent investigations report that polydopamine and related materials are probably not of polymeric nature but rather supramolecular aggregates of small oligomers of 5,6-dihydroxyindole (DHI),³ the fundamental building block of eumelanin, the black photoprotectant of skin,⁴ and the natural antioxidant and metal chelating material of *Substantia nigra*.⁵ The deposition method of polydopamine has also been extended to other catecholamines like norepinephrine⁶ and L-DOPA⁷ and by the use of oxidants other than O₂ dissolved in water like metal cations,⁸ sodium periodate and peroxodisulfate.⁹ The

polydopamine and related coatings can easily be functionalized with nanoparticles^{1,10} and with nucleophiles¹¹ constituting ideal substrates for applications as biomaterials^{12–14} and for energy conversion processes,¹⁵ as well as for bioelectronics.¹⁶ This versatility and broad range of applications is due to the fact that polydopamine is used under different forms like films, particles and hollow capsules¹⁷ after reactions at the solid/liquid and liquid/liquid interfaces, for instance, at the oil/water interface in order to stabilize oil in water emulsions.¹⁸ However, to our knowledge, we report for the first time the formation of polydopamine films at the air/water interface when the solution (2 mg/mL dopamine in 50 mM Tris buffer at pH = 8.5) is unstirred, which opens an avenue for new range of applications for this already versatile material. This is a very particular

Received: September 1, 2014

Accepted: September 22, 2014

Published: September 22, 2014

phenomenon since it is a chemical reaction that triggers the self-assembly at the air/water interface and not a physical process like adsorption of already formed amphiphilic species,^{19,20} evaporation induced assembly,²¹ or on water spreading method.²² Indeed once dopamine is oxidized by the oxygen of air and starts to oligomerize, amphiphilic species are created and they migrate at the air/water interface and form a film. In order to see whether that new phenomenon was specific or not to polydopamine, we decided to investigate whether a similar methodology could be used for the formation of polyaniline (PANI) films because PANI is known, as polydopamine, to deposit on the surface of almost all solid materials.^{23–25} Indeed, we find that PANI films form spontaneously at the air/water interface in the absence of agitation from PANI solutions using ammonium peroxodisulfate as the oxidant in acidic conditions (0.1 M HCl). Hence, we suggest that the formation of films at the air/water interface may be a general phenomenon for molecules interacting and self-assembling via long-range interaction like π -stacking and/or hydrogen bonding as we just demonstrated with the examples of PDA and PANI. We believe that in the presence of agitation, the shear stresses are too strong and that the applied forces are stronger than the cohesivity of the membrane. On the other hand, in the absence of agitation, when oxygen is consumed in solution, it is only provided there by means of diffusion, which slows down the dopamine oxidation leading to smaller aggregates. In addition, the probability for those small aggregates to collide with other particles is reduced in the absence of agitation. Altogether, the absence of agitation creates a distinction between the bulk of the dopamine solution and the solution/air interface where the formation of “polydopamine” should be favored. This finding allows one to broaden the functionalization method by polydopamine and polyaniline to such interfaces and also allows some analogies with the surface chemistry of amphiphiles^{19,20} and the related transfer method of films, like the Langmuir–Blodgett and Langmuir Schaeffer transfer methods.²⁶ In this context, we transferred polydopamine and polyaniline films from the air/water interface to solid substrates via Langmuir Schaeffer (LS) leaving a free space on the liquid surface (Figure 1).

Complementary, we found that PANI films can be transferred to solid substrates at the air/water interface (Figure S1) and function as pH sensors owing to the well-known pH triggered doping–dedoping of PANI (Figure S2).

In this Letter, we will focus on the formation mechanism of polydopamine films at the air/water interface (PDA A/W) and the differences between the films in solution (PDA S/L) that are produced by the method described by Lee et al.¹ The versatility of polydopamine self-assembly is conserved with the LS method, and PDA A/W films were successfully deposited on quartz and silicon plates for characterization but also on a hydrophobic PTFE membrane, leaving a polydopamine free space on the surface of water (Figure 2a,b). Only 1 h after the transfer, the free space left by the PDA A/W transfer self-healed, and the film is reformed (Figure S3). This is not so surprising since we have demonstrated previously that dopamine oligomers are present even after 1 week of oxidation in solution and should be able to self-assemble at the air/water interface.²⁷ However, for increased reaction times, longer than 4 h, some cracks appear between the different parts of the film (Figure S4), hence we will focus on the films grown for less than 4 h. These cracks arise from the stress applied on the film by its own weight and the evaporation of water. This shows that

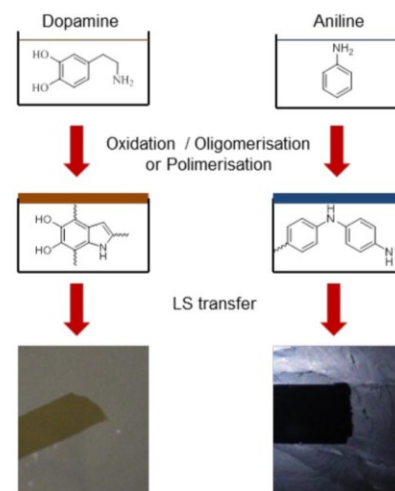


Figure 1. Schematic representation of the formation of polydopamine and polyaniline films at the air/water interface after oxidation and oligomerization/polymerization of dopamine or aniline and representation of the postulated oligomers present in solution. The Langmuir Schaeffer transfer on a substrate leaves a free space (brown and black contrast, respectively) on the surface of the solution.

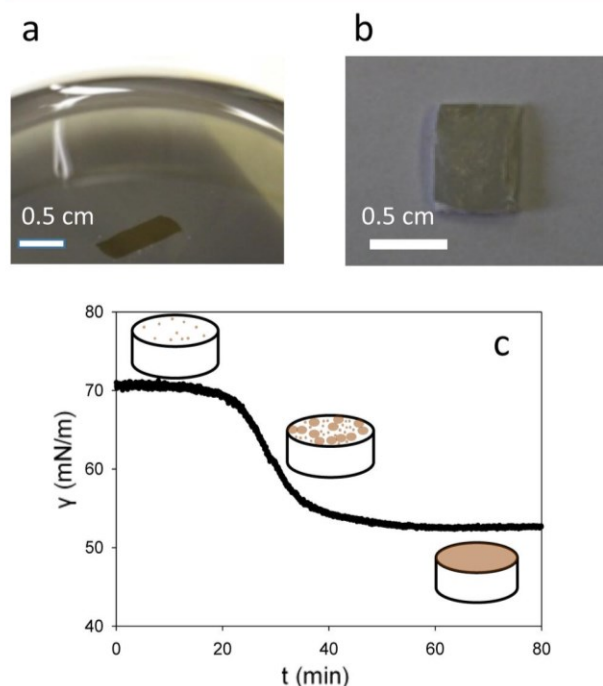


Figure 2. Pictures the surface of a polydopamine film at the air/water interface after the LS transfer (a) on a PTFE membrane (b). (c) Change of surface tension versus time in a pendant drop configuration. The dopamine concentration in the Tris buffer was of 2 mg·mL^{−1}. The scheme depicts the progressive coverage of the air/water interface with polydopamine.

the mechanical properties of pure polydopamine membranes produced at the water/air interface are weak. Their elasticity and the ultimate strength can be improved as shown very recently by Lee et al. by performing the synthesis of composite polydopamine membranes at the air/water interface but in the presence of poly(ethylene imine) in the solution.²⁸

The formation of the PDA A/W films was monitored by drop tensiometry (Figure 2C). Owing to the occurrence of a lag phase of 20 ± 10 min during which no change in surface tension was recorded, we postulate that the formation of PDA A/W films originates from the nucleation of oligomers of DHI at the air/water interface. We also make the assumption that small islands, smaller than the lateral resolution of the Brewster angle microscope (BAM) and hence not yet observable, are formed and then start to coalesce at the moment at which a sudden decrease in the surface tension is observed. Finally the surface tension reaches a plateau after 40 ± 10 min when all the islands coalesced and formed a film. The film continues then to grow on its solution side where the active species are present, as exemplified by thickness measurements of the transferred films (Figure S5) but with no change in surface tension. This hypothesis is supported by BAM images (Figure S6) where the optical contrast continues to increase homogeneously over the time of the experiment. Even if the lag phase preceding a reduction of the surface tension was found in all experiments, the reproducibility of its duration was not excellent. This is a pretty general observation for phenomena implying homogeneous nucleation.

It is not only possible to obtain PDA A/W films from aerated dopamine solutions in Tris buffer but also from acetate buffer (50 mM at pH = 5) using sodium periodate as an oxidant (Figure S7).

These results suggest that the versatility of polydopamine deposition at solid/liquid interfaces, with respect to the chosen oxidant,^{8,9} is also translated at the air/water interface. In addition, it is possible to transfer the PDA A/W films to different kinds of solid substrates among which glass, silicon and more surprisingly PTFE (Figure 2b). The deposited films cannot be detached from all these substrates even under a flow of water, suggesting a strong adhesion which remains to be quantified in future investigations. It will be of particular interest to compare the adhesion strength between the polydopamine films and their substrate in the case of films deposited directly from the solid/solution interface and in the case of films transferred from the water/air interface.

In order to see if any change appears in the physicochemical properties of PDA A/W compared to the films deposited at the solid/liquid interface (PDA S/L), they were characterized by UV-vis spectroscopy, ellipsometry, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), atomic force microscopy, and contact angle measurements. The shape of the absorption spectra of PDA A/W films deposited on quartz slides after 3 h of dopamine oxidation (Figure S8) and of PDA S/L films are identical but the former one display higher absorption values than the later, showing the presence of more light absorbing moieties. Accordingly, ellipsometry allows to calculate that the PDA A/W films deposited on silicon wafers are thicker than the PDA S/L films during the same reaction time (Figure S5). This is most probably due to the higher concentration of O₂ at the air water interface than in the bulk of the dopamine solution. Such an increase in the O₂ concentration at the water/air interface causes the oxidation of dopamine to speed up, the first step in the formation of polydopamine, and is also a possible explanation for the faster deposition of the film. This finding is in agreement with those reported by Xu et al., who showed that the thickness of polydopamine films deposited on solid substrates increases from the bulk to the air/water interface.²⁹ The XPS spectra (Figure S9) of both kinds of films show the presence of all the expected chemical elements present in

polydopamine, namely C, N, O. In addition, the Si 2s signal coming from the silicon substrate progressively decreases with reaction time showing that the films are homogeneous and totally cover the silicon substrates. The N/C ratio of all the films, those obtained at the solid-liquid or after transfer from the air/water interface, was close to 0.12 ± 0.1 , in close agreement with the expected value of 0.125 for polydopamine. However, the C/N ratio for the PDA A/W films seems to be slightly lower than for the PDA S/L films (Table S1). This point requires more careful investigations. At this stage, we cannot exclude that the air/water interface is enriched with more hydrophobic compounds than the films deposited at the solid/liquid interface.

Finally, the water contact angles, θ_w , on PDA A/W films transferred on a PTFE membrane after 3 h of reaction were compared to the contact angle values on PDA S/L films deposited on PTFE from solution. θ_w decreases from $121^\circ \pm 3^\circ$ on pristine PTFE to $77^\circ \pm 4^\circ$ for the PDA A/W films and to $92^\circ \pm 10^\circ$ (Figure S10) for the PDA S/L, which is in agreement with the fact that there is more material at the surface of the PTFE for PDA A/W sample and also to the fact that PDA A/W films smooth out the roughness of the PTFE substrate as seen on the AFM images (Figure S11).

Indeed, the most important difference between the PDA A/W and the PDA S/L films deposited on/in PTFE is their morphology; thanks to the LS deposition method it is possible to completely cover a porous substrate like a PTFE membrane with an homogeneous film and not only to coat the fibers as in the solution method, which is already used in membrane science.³⁰ Figure 3a,b respectively shows a picture and a SEM

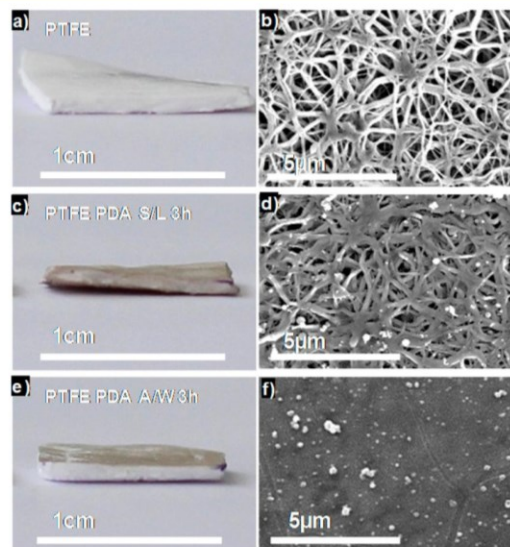


Figure 3. (a,c,e) Pictures and top view SEM images of raw PTFE (b), PTFE PDA S/L after 3 h of reaction (d), and PTFE PDA A/W after 3 h of reaction (f).

topographical image of raw PTFE membrane where many fibers close to the membrane surface are visible. Figure 3c,d shows the PTFE membrane after 3 h of reaction in solution where all the exposed fibers as well as some fibers in the bulk are coated. However, for the PDA A/W film, after 3 h of reaction and subsequent transfer on PTFE (Figure 3e,f), only the face in contact with the interface is covered. In addition, the

underlying fibers are no longer visible. Indeed, this is of particular interest since PTFE membranes are used as biomaterials³¹ and PDA ensures biocompatibility.³² Moreover, at higher magnification (Figure S12) it is possible to have an idea of the fine structure of the PDA A/W film that corroborates the model of film formation through the coalescence of small islands.

Overall, this Letter shows that the formation of amphiphilic species during the oxidation of dopamine (in the presence of different oxidants, e.g., O_2 and IO_4^-) or other molecules like aniline, allow for the deposition of thin films at the air/water interface, provided the solutions are left unshaken. These films can be usefully transferred by the LS method as functional materials on only one side of the chosen substrates without changing its intrinsic properties. The versatile surface chemistry of polydopamine and other poly(catecholamine) based films is hence further extended at fluid interfaces making polydopamine a central player at all kinds of interfaces. In future investigations we will investigate the mechanical properties of these ultrathin membranes and we will also try to increase the cohesion between the different islands by using cross-linking agents. Recently, it has been shown that the presence of polyamines, like poly(ethylenimine), in the dopamine containing solution, allows one to produce robust and stimuli-responsive and Janus-faced membranes at the water/air interface.²⁸ The present work is complementary to the investigation using PEI as a stabilizing agent, because it highlights the formation mechanisms of such pristine polydopamine membranes at the water/air interface and their manipulation with standard methods like the Langmuir–Schaeffer transfer to functionalize challenging materials like PTFE.

■ EXPERIMENTAL METHODS

Chemicals. Dopamine hydrochloride (Product No: H8502, CAS: 62–31–7) and sodium periodate (Product No: 311448, CAS: 7790-28-5) were purchased from Sigma-Aldrich. Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (Product No: 200923-A, CAS: 77-86-1) was obtained from EURODEMEX. Finally anhydrous sodium acetate (Product No: 6268) was purchased from Merck. All chemicals were used as received.

Polydopamine Films at the Air/Water Interface. Dopamine hydrochloride at 2 or 4 mg/mL was dissolved in Tris buffer at 50 mM, pH = 8.5 with oxygen as oxidant or in sodium acetate buffer at 50 mM, pH = 5 with sodium periodate (1 mM) as the oxidant. The solutions were left unstirred for 1, 2, or 3 h of reaction, which are the optimum reaction times. Indeed because of the evaporation of water and the fact that the PDA A/W sticks on the side of the glass, high shears forces appears and lead to the formation of cracks (Supporting Information Figure S1). This phenomenon is observed in situ with a Leica DM 4000 microscope in reflection mode under bright field illumination. The films were transferred on different substrates with the Langmuir–Schaeffer technique at a displacement speed of the substrate in the down direction of 0.01 cm/s and a in the upward direction with a speed of 0.002 cm/s. They were then rinsed thoroughly with pure water and dried under nitrogen flux. After the transfer, the PDA A/W film reformed as it can be seen in Figure S2.

Polydopamine films at the solid/liquid interface: dopamine hydrochloride at 2 or 4 mg/mL was dissolved in Tris buffer at 50 mM, pH = 8.5 with oxygen as the oxidant. The substrates were dipped in the dopamine solutions for 1, 2, or 3 h. They

were then rinsed thoroughly with pure water and dried under nitrogen flux.

Characterization of PDA A/W and S/L films: The surface tension of the dopamine solution/air interface was studied with drop profile analysis tensiometry. Axisymmetric drop shape analysis was applied to a pendant drop of the dopamine solution (2 mg/mL in 50 mM of TRIS buffer). Time dependence of the interfacial tension during surfactant adsorption at the gas/liquid interface was measured using a Tracker tensiometer (Teclis, Longessaigne, France). The pendant drop (typically 6 μ L) was formed at the tip of a stainless steel capillary with a tip diameter of 0.25 mm. The experimental error on the interfacial tension data was ± 1 mN m^{-1} .

Formation of the PDA A/W film was studied with a Brewster angle microscope KSV MicroBAM operating at a wavelength of 659 nm.

The thickness of the PDA A/W and PDA S/L films were measured with an AUTO SE spectroscopic ellipsometer (Horiba, France) operating in the wavelength range between 450 and 900 nm and at a constant incidence angle of 70°. The ellipsometric angles $\psi(\lambda)$ and $\Delta(\lambda)$ were then fitted with a three layer model: a stack of semi infinite silicon, a 2 nm thick SiO_2 layer and a topmost “polydopamine layer”, which was modeled with a semi conductor dispersion curve. We fixed the complex refractive index of the polydopamine layer at $1.73 + 0.02i$ at $\lambda = 632.8$ nm. The surface chemical composition of the PDA A/W and PDA S/L films were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (Hemispherical Energy Analyzer SPECS, PHOIBOS 150) with a monochromatic Al K α (1486.7 eV) source operating at 200 W with an anode voltage of 12 kV. The hydrophilicity of the raw PTFE, PTFE PDA A/W and PTFE PDA S/L surface after 3 h of reaction were characterized by means of water contact angle measurements using a contact angle goniometer (digidrop-gbx, France) equipped with video capture.

For the static contact angle measurements, 3 μ L of distilled water ($\rho = 18.2$ M Ω cm) was dropped on the air side surface of the PTFE membrane at room temperature, and the contact angle was measured after 10 s. At least 10 measurements were averaged to get a reliable value.

AFM images were taken on a Bioscope Catalyst apparatus (Bruker) in the scan assist air mode. SEM micrograph images were taken on an XL SIRION FEG (FEI Company Eindhoven) with an acceleration voltage of 5 kV.

Synthesis of Polyaniline Films at the Air/Water Interface. Aniline and ammonium peroxodisulfate were dissolved in 0.1 mM HCl electrolyte at a concentration of 20 and 25 mM respectively. Two equal volumes of these solutions were mixed under strong magnetic stirring (300 rpm) and then left at rest for 5 h. The PANI film formed at the air/water interface was then transferred on an horizontally hold quartz slide. This film was then put alternatively on top of a concentrated HCL (37% v/v) or a concentrated NH_4OH solution. The color of the PANI changed almost instantaneously, and the spectrum of the film was measured against an uncoated quartz slide taken as a reference. The spectra were acquired with an mc² spectrophotometer (Safas, Monaco) between $\lambda = 200$ and $\lambda = 1000$ nm.

■ ASSOCIATED CONTENT

§ Supporting Information

Additional figures of drop tensiometry experiments, BAM experiments, ellipsometry, UV–visible spectra, XPS spectra,

and SEM images of the PDA A/W and PDA S/L as well as for the PANI films deposited through the LS transfer. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vball@unistra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coating. *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- (2) D'Ischia, M.; Napolitano, A.; Pezzella, A.; Meredith, P.; Sarna, T. Chemical and Structural Diversity in Eumelanins: Unexplored Bio-Optoelectronic Materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3914–3921.
- (3) Della Vecchia, N. F.; Avolio, R.; Alfè, M.; Errico, M. E.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. Building-Block Diversity in Polydopamine Underpins a Multifunctional Eumelanin-Type Platform Tunable Through a Quinone Control Point. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 1331–1340.
- (4) Brenner, M.; Hearing, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 539–549.
- (5) Zucca, F. A.; Giaveri, G.; Gallorini, M.; Albertini, A.; Toscani, M.; Pezzoli, G.; Lucius, R.; Wilms, H.; Sulzer, D.; Ito, S.; et al. The Neuromelanin of Human Substantia Nigra: Physiological and Pathogenic Aspects. *Pigm. Cell Res.* **2004**, *17*, 610–617.
- (6) Kang, S. M.; Rho, J.; Choi, I. S.; Messersmith, P. B.; Lee, H. Norepinephrine: Material-Independent, Multifunctional Surface Modification Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13224–13225.
- (7) Jaber, M.; Lambert, J.-F. A New Nanocomposite: L-DOPA/Laponite. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 85–88.
- (8) Bernsmann, F.; Ball, V.; Addiego, F.; Ponche, A.; Michel, M.; Gracio, J.; Toniazio, V.; Ruch, D. Dopamine-Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution. *Langmuir* **2011**, *27*, 2819–2825.
- (9) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-Induced Dopamine Polymerization for Multifunctional Coatings. *Polymer Chem.* **2010**, *1*, 1430–1433.
- (10) Ball, V.; Nguyen, I.; Haupt, M.; Oehr, C.; Arnoult, C.; Toniazio, V.; Ruch, D. The Reduction of Ag⁺ in Metallic Silver on Pseudomelanin Films Allows for Antibacterial Activity but Does not Imply Unpaired Electrons. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 359–365.
- (11) Lee, H.; Rho, J.; Messersmith, P. B. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 431–434.
- (12) Lynge, M. E.; van der Westen, R.; Postma, A.; Städler, B. Polydopamine—A Nature-Inspired Polymer Coating for Biomedical Science. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4916–4928.
- (13) 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*, 5057–5115.
- (14) Ball, V.; Del Frari, D.; Michel, M.; Buehler, M. J.; Toniazio, V.; Singh, M. K.; Gracio, J.; Ruch, D. Deposition Mechanism and Properties of Thin Polydopamine Films for High Added Value Applications in Surface Science at the Nanoscale. *BioNanoSci.* **2012**, *2*, 16–35.
- (15) Wang, J. T.; Xiao, L. L.; Zhao, Y. N.; Wu, H.; Jiang, Z. Y.; Hou, W. Q. A Facile Surface Modification of Nafion Membrane by the Formation of Self-Polymerized Dopamine Nano-Layer to Enhance the Methanol Barrier Property. *J. Power. Sources* **2009**, *192*, 336–343.
- (16) Ambrico, M.; Ambrico, P. F.; Cardone, A.; Della Vecchia, N. F.; Ligonzo, T.; Cicco, S. R.; Mastropasqua Talamo, M.; Napolitano, A.; Augelli, V.; Farinola, G. M.; d'Ischia, M. Engineering Polydopamine Films with Tailored Behaviour for Next-Generation Eumelanin-Related Hybrid Devices. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 1018–1028.
- (17) Postma, A.; Yan, Y.; Wang, Y. J.; Zelikin, A. N.; Tjijto, E.; Caruso, F. Self-Polymerization of Dopamine as a Versatile and Robust Technique to Prepare Polymer Capsules. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3042–3044.
- (18) Quignard, S.; Chen, Y.; d'Ischia, M.; Fattacioli, J. UV-Induced Fluorescence of Polydopamine-Coated Emulsion Droplets. *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 1254–1257.
- (19) Taylor, D. J. F.; Thomas, R. K.; Penfold, J. Polymer/Surfactant Interactions at the Air/Water Interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *132*, 69–110.
- (20) Bain, C. D.; Claesson, P. M.; Langevin, D.; Meszaros, R.; Nylander, T.; Stubenrauch, C.; Titmuss, S.; von Klitzing, R. Complexes of Surfactants with Oppositely Charged Polymers at Surfaces and in Bulk. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *155*, 32–49.
- (21) Shao, J. J.; Lv, W.; Guo, Q. G.; Zhang, C.; Xu, Q.; Yang, Q. H.; Kang, F. Y. Hybridization of Graphene Oxide and Carbon Nanotubes at the Liquid/Air Interface. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3706–3708.
- (22) Nishikawa, T.; Ookura, R.; Nishida, J.; Arai, K.; Hayashi, J.; Kurono, N.; Sawadaishi, T.; Hara, M.; Shimomura, M. Fabrication of Honeycomb Film of an Amphiphilic Copolymer at the Air–Water Interface. *Langmuir* **2002**, *18*, 5734–5740.
- (23) Mac Diarmid, A. G.; Epstein, A. J. Polyanilines—A Novel Class of Conducting Polymers. *Faraday Diss. Chem. Soc.* **1989**, *88*, 317.
- (24) Stejskal, J.; Sapurina, I.; Prokeš, J.; Zemek, J. In-Situ Polymerized Polyaniline Films. *Synth. Met.* **1999**, *105*, 195–202.
- (25) Tosheva, L.; Gospodinova, N.; Vidal, L.; Mihai, I.; Defaux, M.; Ivanov, D. A.; Doyle, A. M. Monopartite Films of Polyaniline. *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 5459–5463.
- (26) Langmuir, I.; Schaeffer, V. J. Composition of Fatty Acid Films on Water Containing Calcium or Barium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 284–287.
- (27) Ponzio, F.; Ball, V. Persistence of Dopamine and Small Oxidation Products Thereof in Oxygenated Dopamine Solutions and in “Polydopamine” Films. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *443*, 540–543.
- (28) Hong, S.; Schaber, C. F.; Denning, K.; Appel, E.; Gorb, S. N.; Lee, H. Air/Water Interfacial Formation of Freestanding, Stimuli Responsive, Self-Healing Catecholamine Janus-Faced Microfilms. *Adv. Mater.* **2014**, DOI: 10.1002/adma.201403259.
- (29) Yang, H.-C.; Wu, Q.-Y.; Wan, L.-S.; Xu, Z.-K. Polydopamine Gradients by Oxygen Diffusion Controlled Autooxidation. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10522–10524.
- (30) Cheng, C.; Li, S.; Zhao, W. F.; Wei, Q.; Nie, S. Q.; Sun, S. D.; Zhao, C. S. The Hydrodynamic Permeability and Surface Property of Polyethersulfone Ultrafiltration Membranes with Mussel-Inspired Polydopamine coatings. *J. Membr. Sci.* **2012**, *417*, 228–236.
- (31) Matthews, B. D.; Pratt, B. L.; Pollinger, H. S.; Backus, C. L.; Kercher, K. W.; Sing, R. F.; Heniford, B. T. Assessment of Adhesion Formation to Intra-Abdominal Polypropylene Mesh and Polytetrafluoroethylene Mesh. *J. Surg. Res.* **2003**, *114*, 126–132.
- (32) Ding, Y. H.; Yang, Z. L.; Bi, C. W. C.; Yang, M.; Zhang, J. C.; Xu, S. L.; Lu, X.; Huang, N.; Huang, P. B.; Leng, Y. Modulation of Protein Adsorption, Vascular Cell Selectivity and Platelet Adhesion by Mussel-Inspired Surface Functionalization. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3819–3829.

Article 7

Biological Responses to Polydopamine Functionalized PTFE

Anne Schneider ¹⁻², Eric Mathieu ¹, Florian Ponzio ¹, Vincent Ball ¹, Pierre Schaaf ¹, François Becmeur ¹⁻², Joseph Hemmerlé * ¹

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex.

² Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Chirurgie Pédiatrique, 67098 Strasbourg Cedex, France

Corresponding author:

Dr. Joseph Hemmerlé

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1121, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

E-mail : hemmerle@unistra.fr

Under submission

Abstract

Diaphragm repair after congenital diaphragmatic hernia is associated with hernia recurrence mostly due to prosthesis failure. Expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE), a synthetic non-degradable biomaterial, is currently used for the repair of diaphragmatic defects. The drawback of e-PTFE is its poor wettability that leads to bonding problems for coatings that could favor implant integration. However polydopamine (PDA) can be deposited as well on organic and on inorganic substrates. Therefore, we assessed the biological responses of a clinically used e-PTFE biomaterial treated with PDA in two different manners: one impregnated with PDA and one coated with a PDA film at one side. Mechanical properties of the raw e-PTFE, the PDA soaked biomaterial and the PDA coated surface were characterized by AFM. Behaviors of primary dermal human fibroblasts and Wharton's jelly stem cells were investigated by electron microscopy. Findings reveal that the mechanical properties at the microscopic scale are not modified by the PDA treatments. Cells spread onto both PDA functionalized substrates. Nevertheless observations disclose numerous focal contacts of the cultured cells evidencing cell attachment and cytoplasmic projections particularly with the nanoscale PDA coating. Results clearly suggest that PDA in general but above all the PDA coating enhance cellular colonization of the implant material.

Introduction

The diaphragm that forms a physical barrier between the thoracic and the abdominal cavities is also the major muscle of respiration. Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a malformation of that partition. Its incidence is around 1 in 2500 births.^[1] CDH requires surgical treatment aimed to close the diaphragmatic defect. It is well known that cell adhesion and proliferation onto and/or within biomaterials depend on the surface characteristics as, for instance, chemistry, wettability and topography. Thus surface features of implant materials play main roles in guiding cellular response, behavior and organization.^[2] To mimic the biological and biomechanical features of the native diaphragm, the biomaterial should favor muscle cell ingrowth and target the formation of functional muscle tissue.^[3]

The ideal biomaterial for use in diaphragm repair has not been defined yet but should be biocompatible, durable and elastic. Nevertheless it is quite difficult to find a biomaterial that fits with all these requirements. Thus, although not elastic, patches of expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE), a synthetic non-degradable biomaterial, are currently used for the repair of diaphragmatic defects.^[3]

Although the chemical and mechanical properties of polytetrafluoroethylene (PTFE) are of high interest in medical applications, including arterial grafts and reconstructive facial surgery, the polymer produced by polymerization of tetrafluoroethylene (known by trademarks such as Teflon® and Gore-Tex®) is inert to most chemicals.^[4] For this reason PTFE is used to make non-stick cooking pans. The

chemical stability of PTFE is related to the strength of the fluorine-carbon bond. When stretched, PTFE forms a strong porous material called expanded PTFE (e-PTFE).^[5]

The poor wettability of PTFE leads to bonding problems in general for coatings. Techniques that provide reactive chemical functionalities are needed to enable the conjugation of bioactive molecules to its surface, thus encouraging biocompatibility and promoting the binding of coatings. The gas plasma surface modification, for instance, has been used to benefit from the bulk properties of PTFE.^[3]

Polydopamine (PDA) was used for the first time in 2007 for the coating of surfaces. The undeniable advantage of PDA is that it can be deposited as well on all organic and on inorganic substrates. The chemical structure of PDA, that incorporates many functional groups such as catechols, quinones, semi quinones and amines is of utmost importance for post-functionalization as a PDA undercoat can serve as a starting layer for further covalent modification.^[6]

In the present study, we assessed the biological responses on a clinically used e-PTFE biomaterial treated with PDA in two different manners, providing two different implant materials. The treatment with PDA of a biomaterial by using a dopamine solution in the presence of dissolved oxygen as an oxidant is a surface chemistry process that allows numerous secondary functionalization methods. Despite its evident interest in the medical field, the dipping of a porous implant material like e-PTFE in a PDA solution leads to a biomaterial sheet with equal properties on each side. Thus we used a deposition technique (Langmuir-Schaeffer technique) that allows to solely modify one side of the porous e-PTFE material.^[7] This last aspect is of high concern in the case of CDH implants, where the expected host responses have to be different for each side: the biomaterial facing the abdominal cavity should not favor tissue adhesions, thus avoiding bowel occlusion.

Here we investigated the behaviors of primary dermal human fibroblasts and Wharton's jelly stem cells on the raw biomaterial, on e-PTFE soaked in a PDA solution and on e-PTFE coated with a PDA film by correlating three different observation techniques: *i.e.*, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM).

Materials and Methods

Polydopamine functionalization of the e-PTFE material:

Polydopamine films at the air/water interface

Such films will be denoted as PDA A/W films in the following.

Dopamine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich. Dopamine hydrochloride at 2 mg.mL⁻¹ was dissolved in Tris buffer at 50 mM, pH = 8.5 with oxygen as the oxidant. Tris(hydroxymethyl) aminomethane was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). All the solutions were prepared from doubly distilled water (Milli Qplus system, $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Note that dopamine was

dissolved in the Tris buffer just before the film deposition experiment at either the air/water or at the solid/liquid interface.

The solutions were left unstirred for 3 hours of reaction which is the optimal reaction time.^[7] Indeed, due to the evaporation of water and the fact that the PDA A/W sticks on the side of the glass, high shear forces appear and lead to the formation of cracks which are detrimental to the film stability at long reaction times. The phenomenon of crack formation is observed *in situ* with a Leica DM 4000M microscope in the reflection mode under bright field illumination. The films were then transferred from the A/W interface on the e-PTFE with the Langmuir-Schaeffer technique at a displacement speed of the substrate toward the film of 0.01 cm.s^{-1} and a in the upward direction with a speed of 0.02 cm.s^{-1} . The substrate is hold horizontally which allows the deposition of the PDA film on only one of its sides. The contact time of the substrate with the PDA film deposited at the air/water interface was of one minute before removal of the substrate in the vertical direction. The films were then rinsed thoroughly with pure water and dried under a stream of nitrogen. The substrates used for this study were 1 mm thick squares of 1 cm^2 of expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) prosthesis (Dualmesh® W.L. Gore and Associates, Flagstaff, AZ).

Polydopamine deposition at the solid/liquid interface

Such films will be denoted as PDA S/L films in the following.

Dopamine hydrochloride at 2 mg.mL^{-1} was dissolved in Tris buffer at 50 mM, pH = 8.5 with oxygen as the oxidant. The samples of e-PTFE were dipped in the dopamine solutions for 3 hours. They were then rinsed thoroughly with pure water and dried under a stream of nitrogen. By this way, both sides of the substrate are coated with PDA.

Cellular evaluation

Cell cultures

Three different prosthetic conditions and one glass-control were studied: non-treated e-PTFE, e-PTFE coated with a PDA film and e-PTFE soaked in a PDA solution. The pretreated substrates were autoclave-sterilized for cell culture.

Primary dermal human fibroblasts were harvested from freshly obtained human preputial connective tissue. The method used is the explant culture: small fragments of connective tissue (about 2 mm^3) were placed in a plastic flask with 2 mL DMEM with 20% FBS, 1% non-essential amino acids and 1% Penicillin/Streptomycin, in the tissue culture incubator. Growth media was primarily changed after 4-5 days, and then 2-3 times a week until confluence.

For the seeding, primary human fibroblasts were used between passages 2 and 4. They were detached from the culture flask by treatment with trypsin/EDTA and seeded onto the pretreated prosthetic specimens at a concentration of 1.10^4 cells/well. They were cultured in DMEM, supplemented with

10% FBS, 1% non-essential amino acids and 1% Penicillin/Streptomycin, at 37°C in a 5% CO₂, 95% air, and humidified atmosphere. DMEM was changed every 48 h and the culture was stopped after 6 days using primary fixation with 4% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde.

Wharton's jelly stem cells (WJ-SC) were enzymatically isolated from fresh human umbilical cords obtained after full-term births. WJ-SC were amplified at a density of $3 \cdot 10^3$ cells/cm² in α -MEM culture medium supplemented with 10% decompartmented FBS, 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B and 1% Glutamax® (v/v, Gibco) and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C with a medium change every two days.

WJ-SC were used at the 3rd passage and seeded onto the prepared prosthetic specimens at a concentration of 10^4 cells/cm². Cells were maintained in α -MEM supplemented with 10% decompartmented FBS, 1% Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B and 1% Glutamax®. The culture was stopped after 2 days using primary fixation with 4 % glutaraldehyde and 1 % paraformaldehyde.

Cellular experiments were approved ethically and methodologically by the local Research Institution (Registration number DC-2015-2364). Informed signed consent was obtained from the patient.

Electron microscopy

Sample processing

PTFE Gore-Tex® samples after cell culture were fixed in a 4 % glutaraldehyde and 1 % paraformaldehyde buffered in sodium cacodylate 0.1 M at pH = 7.4. After 3 washes of 10 min in the same buffer, the samples were post-fixed with 1 % osmic acid in 0.1 M sodium cacodylate solution for 45 min. These chemicals were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Then, the samples were dehydrated in graded series of ethanol of 10 min each. In order to increase the resin impregnation and because it presents a lower viscosity than Epon resin, we used Spurr resin (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The composition of Spurr mix used (adapted for this sample) was the following: 5.90 g of NSA (Nonenyl Succinic anhydride), 4.10 g of ERL4221 (cycloaliphatic epoxide resin), 1.59 g of DER 736 (Diglycidyl ether of polypropyleneglycol) and 0.1 g DMAE (Dimethylaminoethanol) as accelerator.

The Gore Tex® samples were transferred successively in 1 vol Spurr resin/2 vol absolute ethanol for 30 min, 1 vol Spurr resin/1 vol absolute ethanol for 1 h, and finally in 100 % Spurr resin for 2 h. After transfer overnight in 100 % Spurr resin, the Gore Tex® samples were embedded in freshly prepared resin and polymerized for 48 h at 60 °C.

To be able to perform ultra-thin sections, we reduced the size of the Gore Tex® samples as much as possible and then re-embedded the trimmed specimens using the above mentioned resin. Ultra-thin sections were performed by using an automatic ultra-microtome Reichert Jung Ultracut E (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a diamond knife. Ultrathin sections were gently

heated at 45 °C during 3 min by putting the diamond knife on a warm plate (Lab-Line Instruments Inc., Ill, USA) to eliminate possible folds.

Ultra-thin sections were collected on 100 mesh carbon-coated formvar-covered TEM grids and stained in a 5 % uranyl acetate solution (Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 20 min. After rinsing in 50 % ethanol grids were double-stained in a 4 % lead citrate solution for 10 min (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Electron microscopy

Transmission electron microscopy was performed by using a Philips EM 208 instrument (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) operating with an accelerating voltage of the electrons of 70 kV. Micrographs were recorded on Kodak SO163 films and scanned with an Epson Perfection scan V500 PRO (Epson France, Levallois-Perret, France).

Scanning electron microscopy was performed on samples that were fixed during 4 h in the same aldehyde solution employed for the TEM preparations and then post-fixed with osmium tetroxide for 1 h. The fixed specimens were dehydrated in a graded ethanol series, critical point dried and gold-palladium coated. Observations were carried out by using a Hitachi TM-1000 (Hitachi, Tokyo, Japan) tabletop scanning electron microscope and a Quanta-250 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands) environmental scanning electron microscope (ESEM).

Atomic Force microscopy

AFM experiments were realized by using a Bioscope Catalyst apparatus (Bruker Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA USA).

For imaging it was operated in the ScanAsyst mode, an exclusive imaging mode based on Peak Force Tapping technology that automatically optimizes imaging parameters. A silicon nitride cantilever with a spring constant of 0.7 N.m^{-1} was used for imaging.

Stiffness measurements were performed at many different areas at room temperature. The MIRO (Microscope Image Registration and Overlay) software was used to select the areas of interest and target discrete points for “Point and Shoot” force measurements. Specimens were indented with borosilicate beads, 10 μm in diameter, mounted on silicon nitride AFM probes (Novascan Technologies, Ames, IA USA) having a nominal spring constant value of 0.06 N/m. The cantilever spring constant is determined with the thermal fluctuation method.^[8] Experiments were carried out at constant approach and withdrawal velocities. To characterize the micro-scale stiffness of the CDMs, the recorded force curves were processed manually using the commercial NanoScope Analysis software (Bruker Corporation, Santa Barbara, CA USA), which offers a full suite of force curve analysis tools. The Young moduli of the surfaces were obtained by fitting the Hertz law ^[9] to the approach curve from the contact point up to a point corresponding to an indentation not exceeding a few percent of the radius of the colloidal probe.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks by means of the computer software package SigmaStat® (SPSS Inc., Chicago, IL. USA).

Results

The observations by SEM of the crude e-PTFE biomaterial (Figure 1A), the PDA impregnated biomaterial (Figure 1B) and the PDA coated e-PTFE surface (Figure 1C) revealed quite different surface features. The raw implant material exhibited a highly fibrillar texture that generates a micrometric porosity (Figure 1A). The solution-treated biomaterial kept the fibrillar surface structure of the e-PTFE, but one can note a thickening of the individual fibers (Figure 1B). In contrast, the implant material coated with PDA by the Langmuir-Schaeffer technique showed a rather flat surface (Figure 1C). At higher magnification, it appeared that the PDA coating is of granular nature (Figure 1D). The cracks of the thin PDA layer disclosed the fibrils of underlying e-PTFE. The white spots on the PDA treated samples (Figures 1B,C) correspond to PDA aggregates. Both the soaked and the coated e-PTFE were also visualized by AFM by using a very gentle imaging mode where the tip-sample interactions are continuously controlled. AFM clearly showed that in the soaked biomaterial the individual fibrils at the surface of the e-PTFE are decorated with tiny PDA particles measuring between 35 and 60 nm (Figure 2A), whereas the surface of the coated e-PTFE is covered by a film of similarly sized PDA grains (Figure 2B). TEM observation of a cross-cut of the PDA coating deposited by the Langmuir-Schaeffer method revealed that the biomaterial is covered by a 80 nm thick PDA film (Figure 2C).

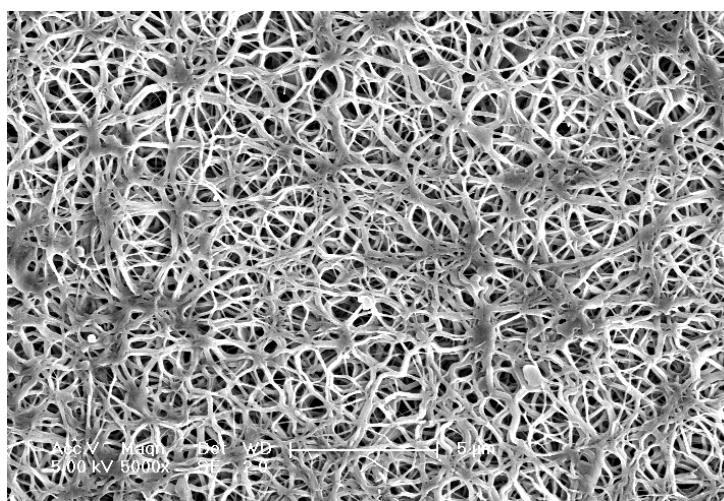


Figure 1A. SEM micrograph of the porous e-PTFE biomaterial. Scale bar = 5 μm.

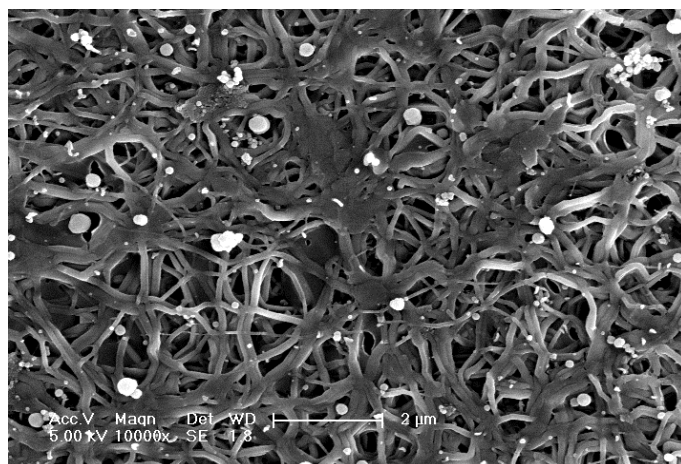


Figure 1B. SEM micrograph of the e-PTFE material impregnated with a polydopamine solution. Scale bar = 2 μm.

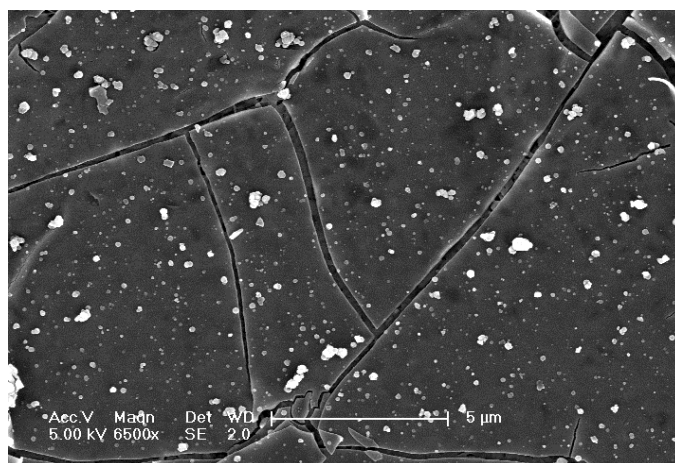


Figure 1C. SEM micrograph of the polydopamine covered implant material. Cracks show the e-PTFE substrate. Scale bar = 5 μm.

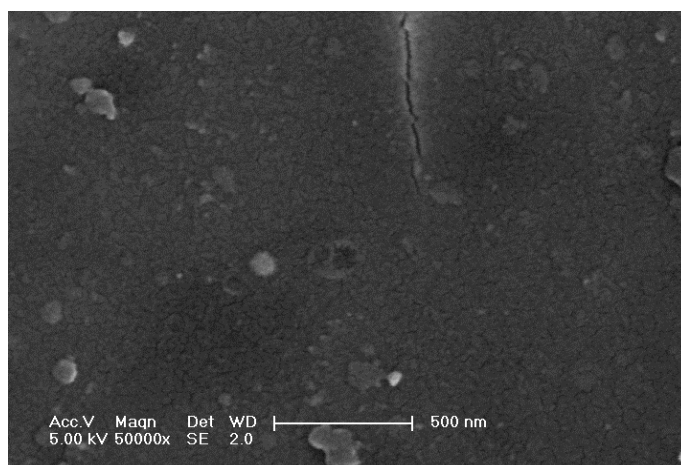


Figure 1D. High magnification SEM micrograph revealing the granular aspect of the polydopamine layer deposited by the Langmuir-Schaeffer method. Scale bar = 0.5 μm.

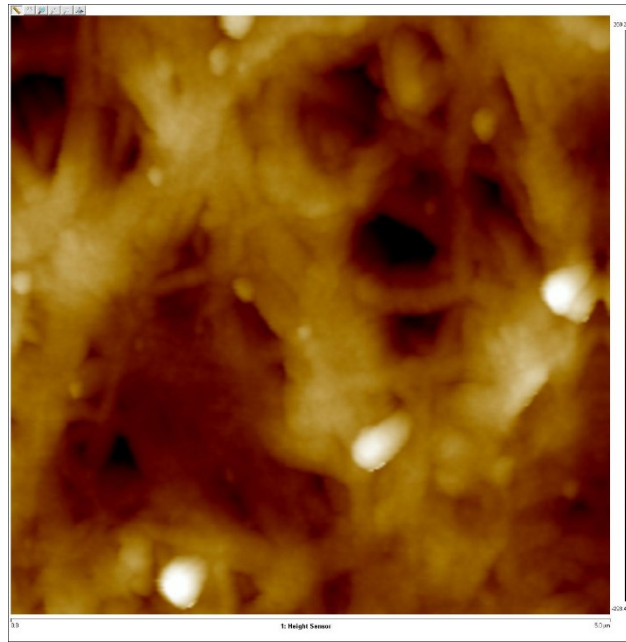


Figure 2A. AFM height image of the biomaterial impregnated with a polydopamine (PDA) solution. Although coated by tiny PDA granules, the fibers of the e-PTFE material are still recognizable. Side of the square = 5 μm .

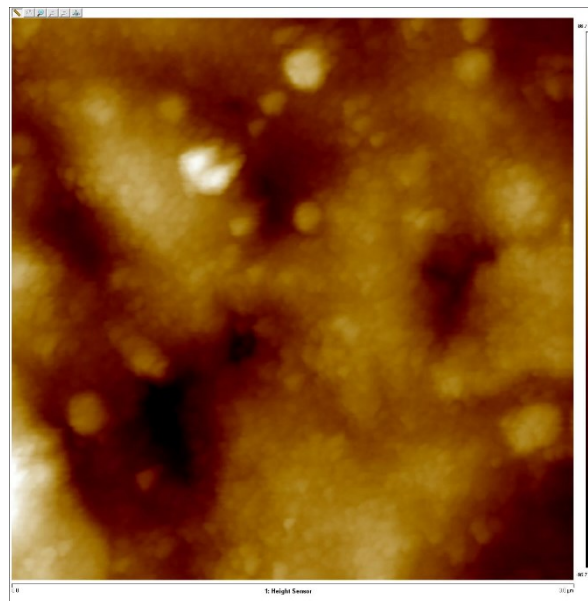


Figure 2B. AFM height image of the biomaterial coated with a polydopamine (PDA) film. The PDA layer shows a granular texture. Side of the square = 3 μm .

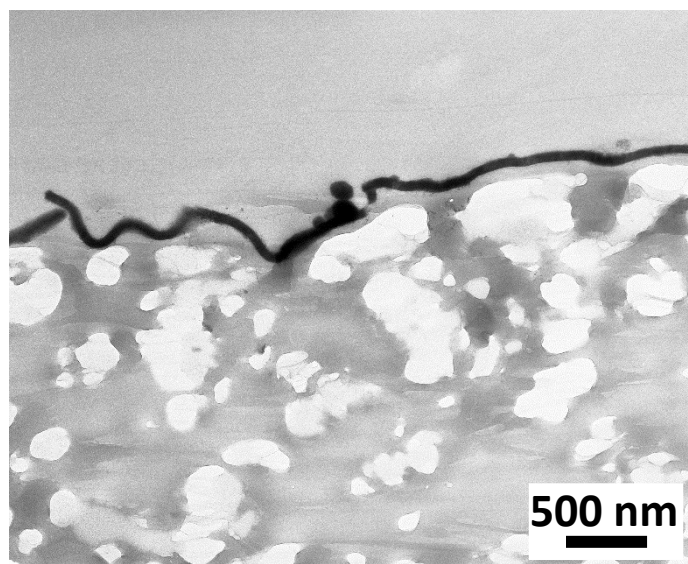


Figure 2C. TEM micrograph showing a polydopamine film lining the biomaterial's surface. Scale bar = 500 nm.

The mechanical properties of the raw e-PTFE (Figures 3A,B), the PDA soaked biomaterial (Figure 3C) and the PDA coated e-PTFE surface (Figure 3D) were measured by AFM. Due to the distribution of nodes within the fibrillar PTFE network (Figure 3A), the histogram of the Young moduli of the raw PTFE material measured by AFM suggested a bimodal distribution of the stiffness (Figure 3B). Similar results were obtained for PTFE soaked in a PDA solution (Figure 3C) as well as for PTFE coated with a PDA film (Figure 3D). This bimodal distribution of the respective histograms are mirroring the heterogeneity of the biomaterial. According to the Kruskal-Wallis one way analysis on ranks, there were no statistically differences ($p = 0.484$) between the Young moduli of the three surfaces; i. e. raw PTFE, PDA impregnated PTFE and PDA coated PTFE.

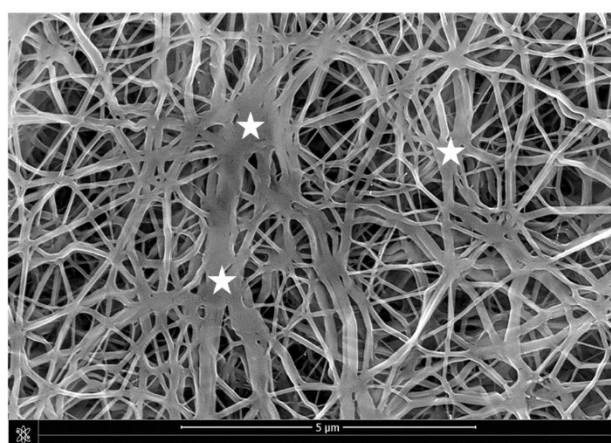


Figure 3A. SEM micrograph showing the fibrillary structure of the e-PTFE material. One can note the distribution of nodes (stars) within the PTFE network. Scale bar = 5 μm .

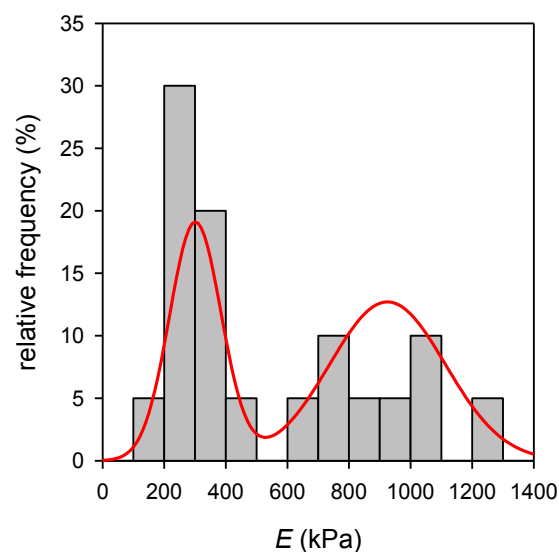


Figure 3B. Histogram of the Young moduli of the e-PTFE raw material measured with AFM ($n = 20$). It suggests a bimodal distribution of the stiffness mirroring the heterogeneity of the material.

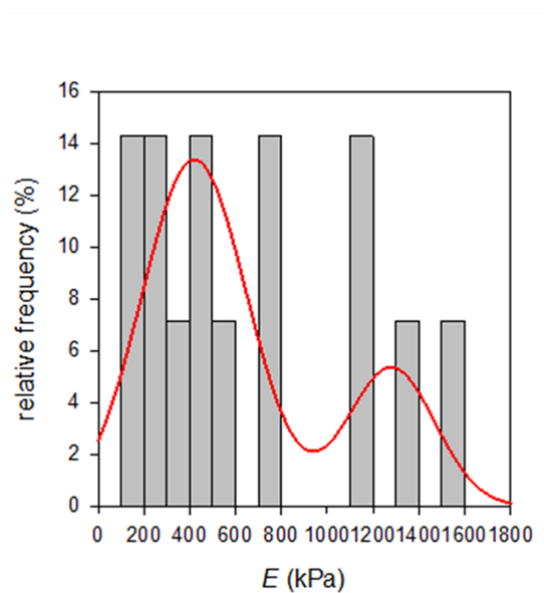


Figure 3C. Histogram of the Young moduli of e-PTFE soaked in a polydopamine solution measured by AFM ($n = 14$). It suggests a bimodal distribution of the stiffness mirroring the heterogeneity of the biomaterial.

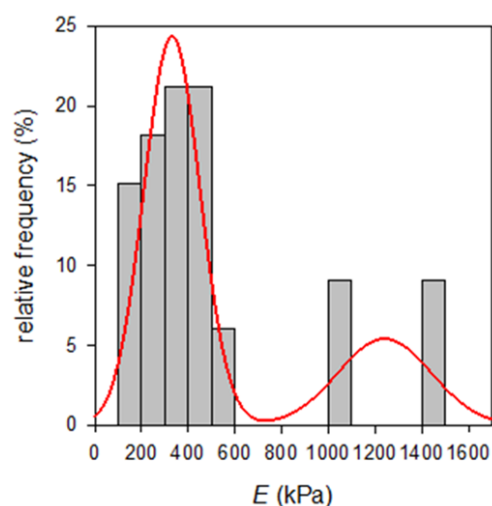


Figure 3D. Histogram of the Young moduli of e-PTFE coated with a polydopamine film measured by AFM ($n = 33$). It suggests a bimodal distribution of the stiffness mirroring the heterogeneity of the biomaterial.

The cellular behavior of primary fibroblasts and WJ-SC on the PDA impregnated biomaterial were assessed by transmission electron microscopy and environmental scanning electron microscopy. TEM observations revealed that fibroblasts exhibiting typical elliptical nuclei were lining the e-PTFE substrate (Figure 4A). The abundant endoplasmic reticulum emphasized their active state (Figure 4B). ESEM observation carried out on stem cells cultured onto the PDA soaked PTFE confirmed the cell spreading at the biomaterial's surface (Figure 4C).

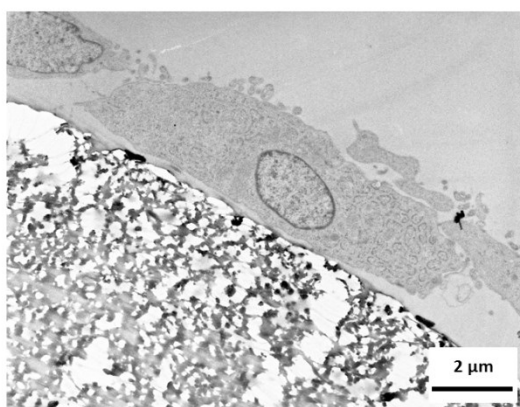


Figure 4A. TEM micrograph from primary fibroblasts cultured onto e-PTFE soaked in a polydopamine solution. Scale bar = 2 μm .

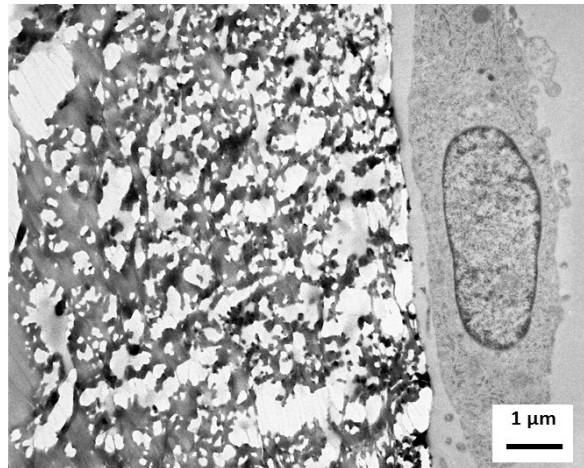


Figure 4B. TEM micrograph showing a primary fibroblast lining e-PTFE soaked in a polydopamine solution. Scale bar = 1 μm .

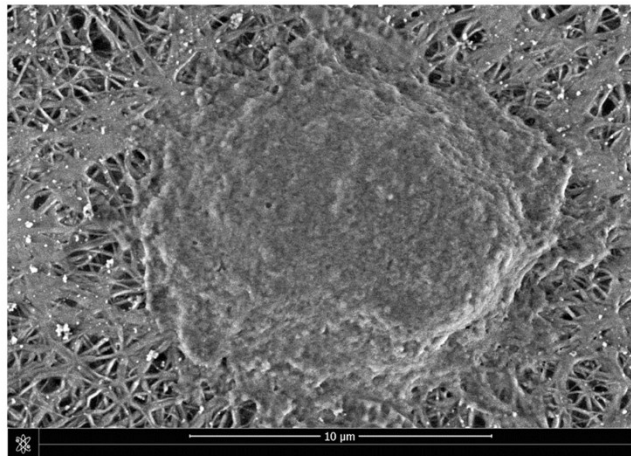


Figure 4C. ESEM micrograph showing a Wharton's jelly stem cell spread onto polydopamine soaked e-PTFE. Scale bar = 10 μm .

The cellular behavior of primary fibroblasts and WJ-SC was also investigated, by using the same techniques, on the PDA coated biomaterial. These observations revealed a very close contact between the fibroblast layer and the PDA film (Figures 5A,B). Moreover, AFM imaging disclosed collagen fibers synthesized by the fibroblasts onto the underlying PDA substrate (Figure 5B, insert). The numerous focal contacts exhibited by the cultured cells emphasized cell attachment to the nanoscale PDA coating (Figure 5C). When cells were put onto e-PTFE which was imperfectly covered by a PDA layer, one can note that cells grew preferentially over the PDA coated areas and, more interestingly, send cytoplasmic projections toward the PDA coating (Figure 5D).

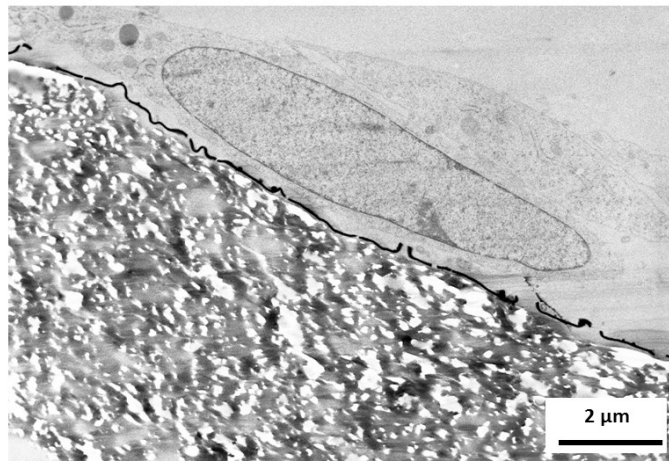


Figure 5A. TEM micrograph showing the growth of primary fibroblasts at the surface of e-PTFE coated with a polydopamine film. Scale bar = 2 μm .

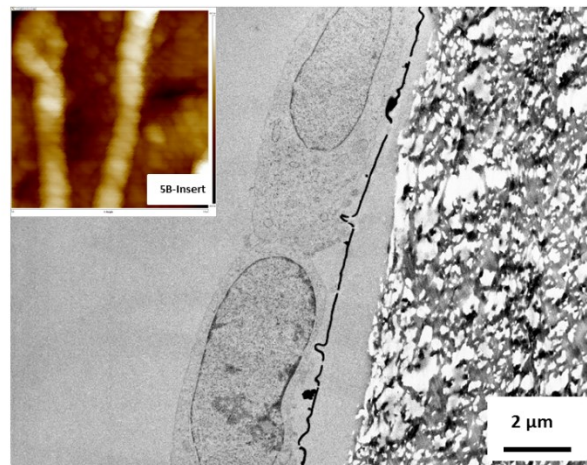


Figure 5B. TEM micrograph exhibiting the close contact of primary fibroblasts cultured onto the polydopamine (PDA) coated biomaterial. Scale bar = 2 μm . **5B-Insert.** AFM height image showing two collagen fibers synthesized by primary fibroblasts cultured onto PDA coated e-PTFE. The underlying PDA layer exhibits its characteristic granular texture. Side of the square = 1 μm .

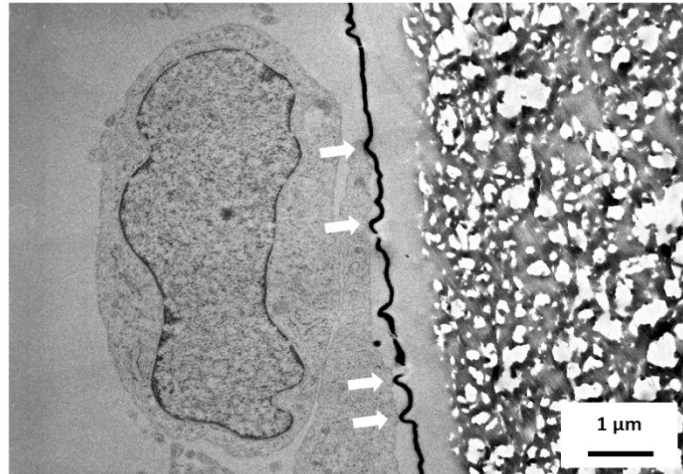


Figure 5C. TEM micrograph showing several focal contacts (Arrows) by which fibroblasts attach to the underlying polydopamine film. Scale bar = 1 μm .

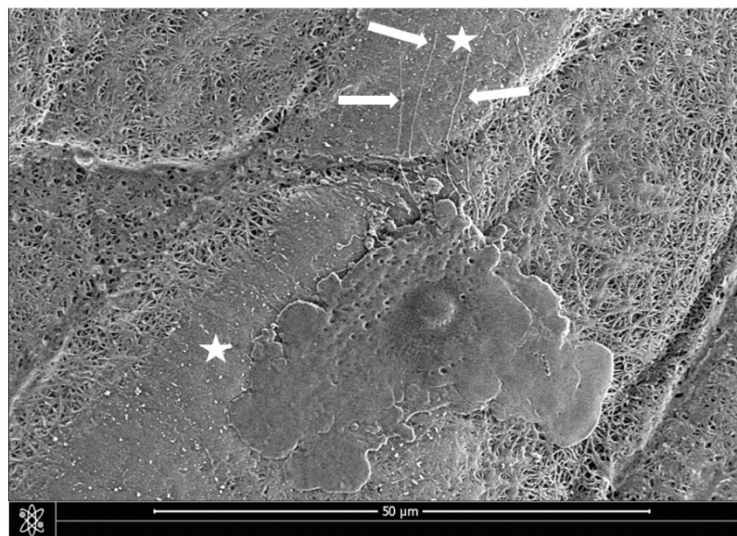


Figure 5D. ESEM micrograph showing a Wharton's jelly stem cell spread onto polydopamine (PDA) coated e-PTFE. One can note that cytoplasmic projections (Arrow) are oriented toward the PDA coated area (Star). Scale bar = 50 μm .

Discussion

At the majority of referral centers, a prosthesis of ePTFE continues to be favored for the surgical repair of congenital diaphragmatic hernia.^[1] Also collective experience has demonstrated that CDH outcome is dependent on patient factors, as hernia side and presence of associated anomalies,^[10] it also appears that the biological host response is of utmost importance. Indeed, the rapid growth that takes place during infancy and continuous movements due to breathing lead to traction and eventual

detachment of the prosthesis.^[11] Hence the tissular integration of the implanted patch is desirable. The periphery of the biomaterial is probably the best path of cellular and capillary ingrowth. Undoubtedly pores facilitate the ingrowth of host-derived cells into the implant. This is the reason behind the porosity of the e-PTFE (Figure 1A). For instance, it has been demonstrated that the endothelial coverage of PTFE surfaces can be modified simply by changing the porosity of the graft.^[12]

Cellularization of a biomaterial that separates the two large body cavities is not trivial, as many biomaterials used for tissue engineering applications lack cell-adhesiveness.^[13] For this reason, PTFE has to be chemically activated and subsequently modified by grafting specific peptides.

Here we reported two functionalization strategies of the e-PTFE material using PDA. The first method consisted in an impregnation of the biomaterial with PDA. SEM observations revealed that this treatment led to a thickening of the individual PTFE threads, thus causing a decrease of the porosity (Figure 1B). A second functionalization technique consisted in the deposition of a thin PDA film at only one side only of the biomaterial sheet (Figure 1C). AFM observations showed that both PDA functionalizations consisted in the coalescence of nano-sized particles (Figures 1D, 2A,B). When the biomaterial was immersed in a PDA solution, it appeared that the fibrils of the porous PTFE architecture were decorated with PDA grains (Figure 2A). On the other hand, the coverage of the implant material with a PDA film, by using the Langmuir-Schaeffer method, disclosed a more or less uniform granular coating (Figures 1D, 2B). The ultrathin PDA layer, measuring less than 100 nm in thickness, fitted plane to the irregular surface (Figure 2C). It was so thin that the total quantity of active material is kept to a minimum. The possibility to cover solely one side of the implant with a PDA nanolayer is surgically spoken of the highest importance, since adhesions have been associated with CDH repair with prosthetic patches. The Langmuir-Schaeffer technique offers the prospect of producing implants with sides having different surface properties. Moreover, almost any sheetlike biomaterial could be treated by this way.

As mechanical properties of a substrate are able to influence single and collective cell behaviors,^[14] it seemed relevant to investigate the potential changes of the Young moduli inherent to both functionalization methods. SEM micrographs showed that the e-PTFE surface consisted of PTFE strands that intersect, thus forming denser areas (Figure 3A). Therefore, the biomaterial surface is actually divided in two different fields, i.e. scattered threads or compact nodes. The Colloidal probe AFM technique confirmed this observations. Histogram of the Young moduli of the PTFE raw material measured with AFM suggests a bimodal distribution of the stiffness manifesting the described heterogeneity of the material (Figure 3B). Colloidal probe AFM analyses carried out on the e-PTFE soaked in the PDA solution also revealed a bimodal distribution of the stiffness, similar to that of the raw biomaterial (Figure 3C). Nevertheless, a very slight increase of the stiffness value can be mentioned. But, surprisingly the deposition of an ultrathin PDA film, although hiding the architecture of the PTFE construct, does not alter the bimodal distribution of the stiffness (Figure 3D). Accordingly, one can expect that cellular responses will not be impacted by mechanical factors.

In the present study we investigated by TEM and ESEM, the behavior of primary fibroblasts and WJ-SC grown onto raw e-PTFE, PDA soaked biomaterial and PDA-coated implant surfaces. Ultrathin sectioning of the porous e-PTFE with the cellular material on its surface was a challenge, since the implanted material remains very soft compared to the embedding resin.^[15] Indeed some authors performed TEM analysis on PTFE vascular grafts in animals, but they never presented intact interfaces between PTFE and biological material.^[16] Even more recent reports emphasize the difficulty to show complete undamaged interfaces between the biomaterial and the surrounding biological tissues.^[17] It seems also noteworthy to mention that the ESEM technique limits potential artefacts that are likely to appear after dehydration and metal coating of biologic specimens.

Thorough analyses of intact interfaces between e-PTFE impregnated with PDA and fibroblasts revealed a close lining of the biomaterial by a cell layer (Figures 4A,B). ESEM observations in environmental conditions and without metal coating, disclosed a satisfying spread of cells onto PDA soaked e-PTFE (Figure 4C). TEM micrographs from fibroblasts grown onto the PDA ultrathin film showed similar results (Figures 5A,B). AFM investigations disclosed the synthesis of collagen fibers with typical banding at the PDA-covered biomaterial (Figure 5B-insert). However, when cells were seeded on the PDA coating, much more focal contacts were evident (Figure 5C). It must be pointed out that, in the case of PDA-coating defaults, cells grew preferentially onto the PDA covered areas and tended to spread toward the PDA nanolayer (Figure 5D).

Conclusion

Our results strongly suggested that the PDA functionalization is a smart method to simply modify the surface of biomaterials. Furthermore the PDA nano-sized coating we described in this study offers an easy way to produce two-sided patches for CDH repair. Observed cellular behaviors emphasized the interest of the method to optimize surgical implantation and maximize long-term graft function.

References

- [1] The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group, *Pediatrics* **2007**, *120*, e651.
- [2] a) D. E. Discher, P. Janmey, Y. L. Wang, *Science* **2005**, *310*, 1139; b) A. W. Orr, B. P. Helmke, B. R. Blackmann, M. A. Schwartz, *Dev. Cell* **2006**, *10*, 11.
- [3] S. Kalaba, E. Gerhard, J. S. Winder, E. M. Pauli, R. S. Haluck, *Bioact. Mater.* **2016**, *1*, 2.
- [4] S. A. Visser, R. W. Hergenrother, S. L. Cooper, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. (Eds: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons), Elsevier Academic Press, London, UK **2004**, p. 50.
- [5] B. D. Matthews, B. L. Pratt, H. S. Pollinger, C. L. Backus, K. W. Kercher, R. F. Sing, B. T. Heniford, *J. Surg. Res.* **2003**, *114*, 126.
- [6] Y. Liu, K. Ai, L. Lu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5057.

- [7] F. Ponzio, P. Payamyar, A. Schneider, M. Winterhalter, J. Bour, F. Addiego, M. P. Krafft, J. Hemmerlé, V. Ball, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, 5, 3436.
- [8] H. J. Butt, M. Jaschke, *Nanotechnology* **1995**, 6, 1.
- [9] H. Hertz, *Journal für die reine und angewandte Mathematik* **1881**, 92, 156.
- [10] J. C. Fisher, M. J. Haley, A. Ruiz-Elizalde, C. J. Stolar, M. S. Arkovitz, *J. Pediatr. Surg.* **2009**, 44, 1173.
- [11] D. O. Fauza, *Semin. Pediatr. Surg.* **2014**, 23, 135.
- [12] A. W. Clowes, T. R. Kirkman, M. A. Reidy, *Am. J. Pathol.* **1986**, 123, 220.
- [13] M. Gabriel, K. Niederer, M. Becker, C. M. Raynaud, C. F. Vahl, H. Frey, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 1216.
- [14] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, 126, 677; R. G. Breuls, T. U. Jiya, T. H. Smit, *Open Orthop. J.* **2008**, 2, 103.
- [15] A. Schneider, I. Talon, E. Mathieu, P. Schaaf, F. Becmeur, J. Hemmerlé, *J. Biomater. Appl.* **2017**, 31, 844.
- [16] a) A. W. Clowes, T. R. Kirkman, M. A. Reidy, *Am. J. Pathol.* **1986**, 123, 220; b) S. Mellander, P. Fogelstrand, K. Enocson, B. R. Johansson, E. Mattsson, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2005**, 30, 63.
- [17] D. V. Bax, Y. Wang, Z. Li, P. K. Maitz, D. R. McKenzie, M. M. Bilek, A. S. Weiss, *Biomaterials* **2011**, 32, 5100.

Caractérisation et optimisation de biomatériaux pour le traitement de la Hernie Diaphragmatique Congénitale à large défaut

Résumé

Les prothèses diaphragmatiques en ePTFE utilisées dans la hernie diaphragmatique congénitale à large défaut ont une faible étirabilité, ce qui entrainera des récurrences herniaires au cours de la croissance de l'enfant. En effet, l'analyse en imagerie montre que la surface du diaphragme grandit de 4-5 fois jusqu'à l'adolescence. De plus, les mesures de rigidité des surfaces de prothèses explantées, montrent l'influence des contraintes mécaniques appliquées sur la structure des matrices extracellulaires néoformées. Afin de favoriser l'intégration tissulaire du ePTFE, nous avons testé un moyen de fonctionnaliser le ePTFE avec la polydopamine sur une seule face. Le revêtement nanoscopique favorise la colonisation cellulaire. Enfin, ce travail de thèse présente une méthode originale de réalisation d'une nouvelle membrane bicouche avec des propriétés mécaniques conformes aux exigences chirurgicales. Ce biomatériau innovant et prometteur fait actuellement l'objet d'une Déclaration d'invention.

Mots-clés : Hernie diaphragmatique ; biomatériau ; microscopie électronique ; AFM ; fonctionnalisation.

Résumé en anglais

Electron microscopy assessments of ePTFE prosthesis explants for diaphragmatic congenital hernia repair strongly suggest that the tissue responses are directly related to the surface microstructure of the biomaterial. AFM measurements (Young moduli) emphasize the influence of the mechanical stress applied to the implant on the mechanical properties of the newly formed extracellular matrices. In order to guide the host responses, we undertook to functionalize with polydopamine the ePTFE biomaterial. Electron microscopy investigations reveal the interest of that surface treatment regarding cell colonization of implant. To optimize that approach, we developed an original method aimed to coat only one face of the biomaterial. After determination of the growth rate of the diaphragm from birth to adolescence, we explored the possibility to design a new double-faced mesh able to follow body growth. From this point of view, the initial prototypes are promising and under patent application.

Keywords : Diaphragmatic hernia ; biomaterials ; electronic microscopy ; AFM ; functionalization.