

Nature des réponses tissulaires et importance des propriétés micromécaniques de biomatériaux explantés et fonctionnalisés pour des applications en chirurgie viscérale : exemple de la hernie diaphragmatique congénitale

Tissue Responses and Mechanical Properties of Explanted and Functionalized Polytetrafluorethylene and of a Newly Designed Biomaterial for Visceral Surgery

Anne Schneider MD [1], Joseph Hemmerlé [2]

1. Service de Chirurgie Pédiatrique - Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.
2. Inserm UMR S 1121 - Biomatériaux et Bio-ingénierie tissulaire - Strasbourg.

Résumé

Des investigations par microscopie électronique à balayage et en transmission d'explants de prothèses diaphragmatiques en polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE) ont montré que la réponse tissulaire dépend 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. Les mesures, par microscopie à force atomique, des modules d'Young ont révélé l'influence des contraintes mécaniques appliquées sur les propriétés mécaniques des matrices extracellulaires nouvellement synthétisées.

Dans le but de guider les réponses de l'hôte, nous avons entrepris de fonctionnaliser le e-PTFE. Les observations soulignent l'intérêt de ce procédé en termes de colonisation cellulaire. Pour optimiser cette approche, nous avons ensuite développé une méthode originale de traitement d'une seule face de l'implant. Les travaux de microscopie démontrent que cette nouvelle technique de fonctionnalisation du PTFE favorise l'intégration tissulaire, avec la présence de points d'adhésion focaux entre les cellules fibroblastiques et le revêtement nanoscopique.

Après avoir déterminé le taux de croissance du diaphragme de la naissance à l'adolescence, nous avons exploré l'utilisation de l'électrofilage pour créer un nouveau matériau double-face susceptible de s'adapter aux variations dimensionnelles inhérentes à la croissance corporelle. De ce point de vue, les premiers prototypes réalisés sont prometteurs.

Mots clés

- ◆ Hernie diaphragmatique congénitale
- ◆ PTFE
- ◆ Microscopie électronique
- ◆ Electrospinning

Abstract

Scanning and transmission electron microscopy assessments of expanded polytetrafluorethylene (e-PTFE) diaphragmatic prosthesis explants strongly suggest that the tissue responses are directly related to the surface microstructure of the porous biomaterial. The rough surface of the implant material (Goretex[®] Dualmesh) favors cell growth and connective tissue penetration. Atomic force microscopy 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 the e-PTFE biomaterial. Electron microscopy investigations reveal the interest of that surface treatment regarding cell colonization of implants. To optimize that approach, we developed an original method aimed to coat only one face of the biomaterial. Ultrastructural analyses demonstrate that this new functionalization technique enhances tissue integration. Electron micrographs disclose the presence of focal contact points between fibroblasts and the nanoscale coating.

After determination of the growth rate of the diaphragm from birth to adolescence, we explored the possibility to design, by electrospinning, a new biomaterial able to follow body growth. From this point of view, the initial prototypes are promising.

Keywords

- ◆ Congenital diaphragmatic hernia
- ◆ PTFE
- ◆ Electrospinning
- ◆ Electron microscopy

Correspondance

Dr Anne Schneider

Service de Chirurgie Pédiatrique - Hôpital de Hautepierre- Avenue de Molière 67200 Strasbourg.

E-mail : anne.schneider@chir-pediatrique.fr - Tél : 03 88 12 73 07

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 (1). Le traitement des HDC à large défaut consiste à fermer l'orifice pathologique avec une membrane prothétique (2). Bien que le geste chirurgical soit maîtrisé et que la réparation avec une prothèse herniaire soit efficace, on note malheureusement un taux de récurrence de l'ordre 50 % (3). Et c'est dans le but de réduire le nombre de ces échecs implantaires que nous avons conduit des travaux de caractérisation et d'optimisation du biomatériau le plus utilisé actuellement pour le traitement de la HDC à large défaut. Il s'agit du polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE), un matériau synthétique non-dégradable qui est utilisé pour cette application dans plus de 80 % des cas de remplacement diaphragmatique (4).

Mesures de la croissance diaphragmatique

Comme la plupart des récurrences herniaires résultent d'un « lâchage » de la prothèse en e-PTFE, nous avons aussi entrepris de définir un cahier des charges précis pour des implants destinés à être utilisés dans le contexte de la HDC. Or, 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 (5). Devant ce constat, 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'une coupole diaphragmatique grandit entre quatre et cinq fois sur la période considérée (6). 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.

Optimisation du biomatériau le plus utilisé : e-PTFE

La propriété majeure qui justifiait l'emploi du PTFE comme biomatériau est son inertie chimique (7). Néanmoins, cette propriété du PTFE constitue en même temps sa faiblesse en termes d'intégration tissulaire. En effet, pour ainsi dire aucune substance, ni hydrophile, ni lipophile, ne se lie au PTFE ; ce qui est défavorable à une colonisation cellulaire (8). C'est pourquoi nous avons mené des recherches pour mettre au point une méthode de fonctionnalisation du PTFE chimiquement inerte. Ces travaux expérimentaux ont révélé qu'une solution aqueuse de dopamine permettait d'enrober les fibres de PTFE d'un revêtement de polydopamine (PDA) (Fig 1). La modification de surface du matériau imprégné de PDA augmente l'hydrophilie du biomatériau et favorise sa colonisation cellulaire, comparativement au matériau brut (9-10). Les études par microscopie électronique à balayage (MEB) et en transmission (MET) montrent notamment une multiplication des contacts focaux, ces complexes d'adhérence assurant la liaison entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire ou le substrat de croissance. Ces observations ont pu être vérifiées avec des cultures de fibroblastes primaires et des cellules souches de la gelée de Wharton (11).

Pour optimiser l'intégration tissulaire de la prothèse en PTFE fonctionnalisé avec un revêtement de PDA, nous avons adapté une ancienne méthode de récupération d'un film mince (méthode de Langmuir-Schaeffer) pour transférer et déposer un film de PDA sur une seule face du biomatériau en PTFE (9). En effet, une prothèse pour la réparation de défauts dans le cadre de la HDC devrait empêcher les adhérences sur sa face abdominale et promouvoir la colonisation cellulaire du côté thoracique. Or, le dépôt unilatéral d'un film mince (moins de 100 nm d'épaisseur) de PDA permet de répondre à ce prérequis des prothèses herniaires (Fig 2-1). Les évaluations microscopiques soulignent l'intérêt du recouvrement d'une seule face du biomatériau en PTFE avec un film mince de PDA (Fig 2-2). Comme dans ce cas de figure les cellules vivantes reposent sur une surface plane et non plus sur un substrat fibrillaire, on note davantage de points focaux entre les cellules et le film déposé (Fig 3). Ces observations sont corroborées par le fait que des cellules souches de la gelée de Wharton, cultivées à la surface d'un PTFE imparfaitement recouvert d'un film de PDA, développent des protrusions cellulaires préférentiellement en direction des zones du biomatériau qui ont été fonctionnalisées (Fig 4-1 à 4-3) (11). L'ensemble de ces résultats expérimentaux étaye l'intérêt de la fonctionnalisation du PTFE pour guider la réponse de l'hôte. Ces traitements sont d'autant plus intéressants s'ils peuvent être appliqués de manière unilatérale, sur une seule face du matériau prothétique.

Intérêt des aspects biomécaniques

On sait à présent que les cellules des tissus sondent l'élasticité du milieu environnant (12). D'ailleurs, nos observations microscopiques d'explants de prothèses herniaires montrent que la structuration des matrices extracellulaires produites traduit le rôle des sollicitations mécaniques, via les fils de suture, dans les processus de développement cellulaire (13). Comme les cellules répondent à la rigidité de leur substrat, nous avons mesuré, à l'aide de sondes colloïdales en microscopie à force atomique les modules d'Young des matrices extracellulaires déposées par l'hôte à différents endroits de la surface des biomatériaux explantés. Les mesures micromécaniques réalisées sur le PTFE brut, le PTFE fonctionnalisé et les matrices extracellulaires nouvellement déposées révèlent que la caractérisation de l'environnement des cellules est cruciale (11). Ces données expérimentales permettront, à n'en pas douter, d'optimiser les traitements de surface des biomatériaux pour favoriser l'intégration tissulaire des prothèses herniaires.

Perspectives et conclusions

Comme la conception d'un biomatériau répondant aux critères mécaniques d'étirabilité demandait un certain temps, nous nous sommes penchés dans un premier temps sur des moyens de fonctionnalisation du matériau couramment employé

actuellement : le e-PTFE. 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 (9-11).

Nous nous intéressons actuellement aux aspects biomécaniques liés au traitement de la HDC à large défaut et à la voie des nouveaux biomatériaux. Ainsi, nous avons entrepris de synthétiser des membranes répondant aux critères établis. Nos développements ont abouti à la mise au point d'une membrane bicouche obtenue par la technique d'électrofilage et constituée de polymères de grade médical. 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 conforme aux exigences d'implantation. L'optimisation de la couche fibrillaire permettra de guider l'intégration tissulaire du côté thoracique et la couche opposée, non fibrillaire, est destinée à prévenir les adhérences intestinales. 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 (fonctionnalisation) de la nouvelle membrane est aussi envisagée afin de conjuguer les bénéfices fournis par ces deux voies de recherche.

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.

Discussion en séance

Question de G Pascal

Peut-on appliquer ce type de biomatériaux à d'autres types de défauts pariétaux : omphalocèle, laparoschisis, etc... ?

Réponse

Notre objectif est bien sûr de ne pas nous cantonner au traitement de la HDC. Le problème mécanique de la croissance est omniprésent en pédiatrie. En pédiatrie nous disposons de peu de biomatériaux validés et nous utilisons les mêmes biomatériaux (PTFE) pour la réparation pariétale des omphalocèles géantes, avec également nécessité de réintervenir pour remplacer la prothèse. Ces nouveaux biomatériaux qui pourraient grandir avec l'enfant trouvent ainsi d'autres applications que la seule HDC.

Question de JS Valla

Invasion de la prothèse par des cellules musculaires ?

Réponse

La preuve de concept a été réalisée avec des fibroblastes primaires et a été confirmée avec des cellules souches de la gelée de Wharton. Mais l'objectif est bien entendu d'étendre les investigations aux cellules musculaires.

Questions de F Becmeur

Le travail de recherche est exemplaire : il part d'un constat, simple, per-opératoire : les nouvelles pièces en chirurgie péri-natale et les progrès de la réanimation néo-natale permettent l'émergence de nouveaux patients parmi ceux souffrant de hernie diaphragmatique (Bochdalek). En effet actuellement, certains nouveau-nés porteurs de hernies diaphragmatiques présentent un défaut total de diaphragme requérant un remplacement prothétique.

Mais quelle prothèse, quels matériaux, quelle forme, quel dispositif pour permettre d'accompagner la croissance du nouveau-né vers l'âge adulte ?

Comment fonctionnaliser sa prothèse, quelle nouvelle procédure de fabrication ?

Cette recherche est exemplaire : elle débute sur un constat et elle aboutit à un dépôt de brevet.

Réponse

Merci pour ce commentaire très encourageant. Les progrès médicaux font qu'actuellement de plus en plus de patients avec une pathologie congénitale de forme sévère vont survivre à la période néonatale. Nous nous retrouvons ainsi en face de nouveaux patients avec leur problématique propre et leurs complications à venir. Nous nous devons donc d'adapter nos outils techniques pour répondre à ces demandes et le domaine de la recherche est un allié précieux dans ce combat.

Références

1. Lally KP, Lally PA, Lasky RE, Tibboel D, Jaksic T et al, and The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Defect size determines survival in infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics*. 2007;120:651-7.
2. Moss RL, Chen CM, Harrison MR. Prosthetic patch durability in congenital diaphragmatic hernia : a long-term follow-up study. *J Pediatr Surg*. 2001;36:152-4.
3. Danzer E, Hedrick HL. Controversies in the management of severe congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014;19:376-84.
4. 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;33:1004-9.
5. Rehan VK, Laiprasert J, Wallach M, Rubin MW, Rubin LP, McCool FD. Diaphragm dimensions of the healthy preterm infant. *Pediatrics*. 2001;108:e91.
6. 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;27:177-80.
7. 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;15:416-22.
8. Bellon JM, Bujan J, Contreras L, Hernando A. Integration of biomaterials implanted into abdominal wall : process of scar formation and macrophage response. *Biomater*. 1995;16:381-7.
9. Ponzio F, Payamyar P, Schneider A, Winterhalter M, Bour J et al. Polydopamine Films from the Forgotten Air/Water Interface. *J Phys Chem Lett*. 2014;5:3436-40.
10. 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*. 2018;10:7574-80.
11. Schneider A, Mathieu E, Ponzio F, Ball V, Schaaf P, Becmeur F, Hemmerlé J. Biological Responses to Polydopamine Functionalized PTFE. *Acta Biomaterialia*. submitted.
12. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-89.

13. 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;31:844-50.

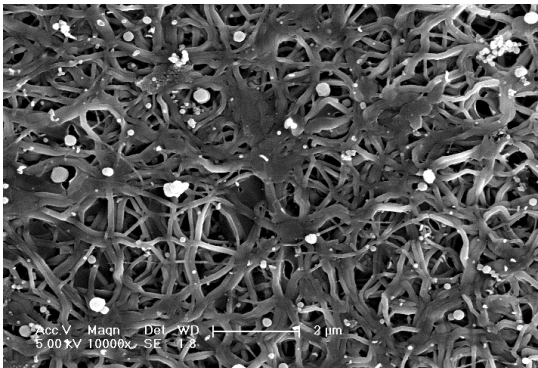


Figure 1 : Fonctionnalisation du PTFE par la PDA en MEB. La PDA enrobe les fibres de PTFE. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

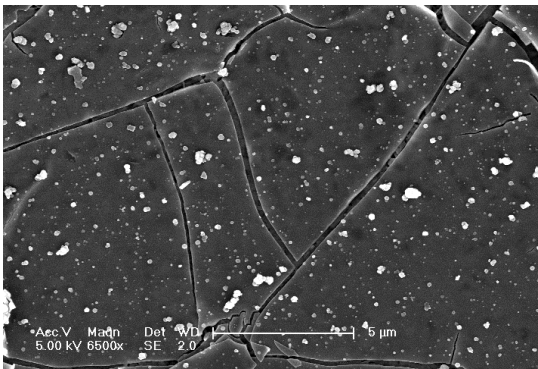


Figure 2-1 : Fonctionnalisation par un film de PDA sur une seule des deux faces du PTFE, en MEB. Les fissures dans le film de PDA transféré laissent entrevoir la structure poreuse de ePTFE sous-jacent. Les particules claires correspondent à des agrégats de PDA.

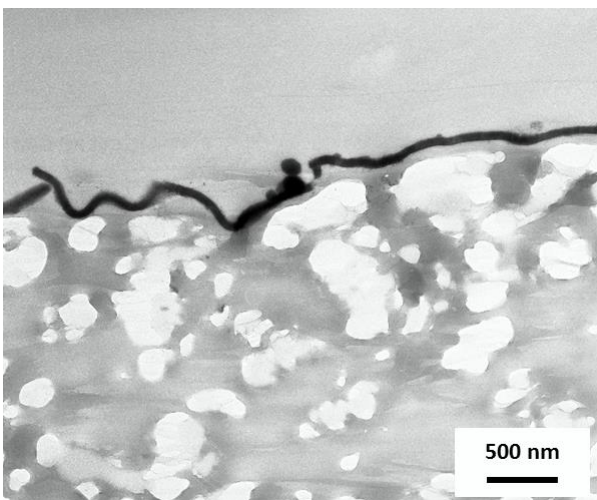


Figure 2-2 : La coupe transversale du film de PDA déposé sur du e-PTFE démontre que ce biomatériau poreux est recouvert d'un film mesurant entre 60 et 80 nm d'épaisseur (MET).

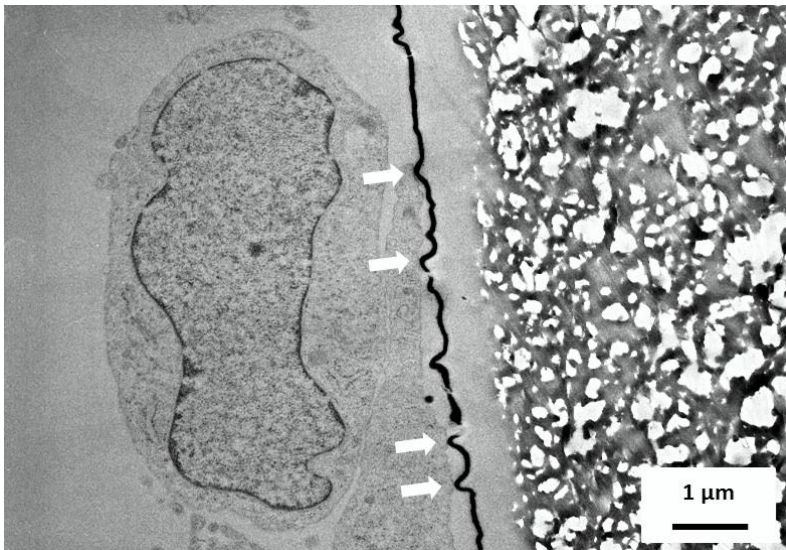


Figure 3 : Micrographie de MET montrant de nombreux points de contact focaux (flèches) entre les fibroblastes primaires et le film PDA.

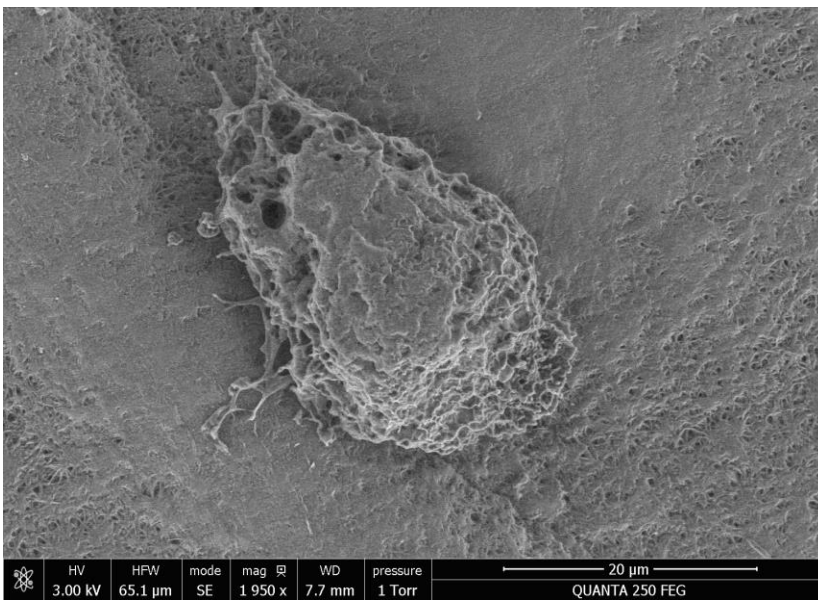


Figure 4-1 : Vue en microscopie environnementale (ESEM) d'une cellule souche de la gelée de Wharton à la surface du e-PTFE vierge. Noter l'absence d'étalement cellulaire et de projection cytoplasmique en direction de la surface du biomatériau.

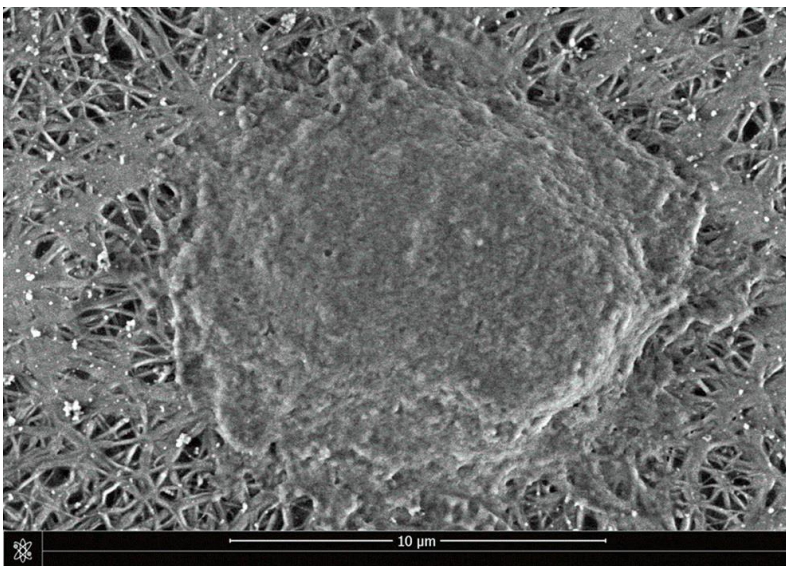


Figure 4-2 : Micrographie de ESEM d'une cellule souche de la gelée de Wharton à la surface du PTFE plongé dans la solution de PDA. Noter l'étalement de la cellule à la surface du e-PTFE fonctionnalisé.



Figure 4-3 : Micrographie de ESEM d'une cellule de la gelée de Wharton étalée préférentiellement à la surface du film intact de PDA. Les flèches marquent des filopodes de la cellule en direction d'une autre zone fonctionnalisée par le film de PDA.