

Année 2003

N° 44

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Laetitia MIGNÉ

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2003

***Modulation de la libération de vancomycine par adjonction
d'agent liant dans des matériaux de comblement osseux
préparés par compression isostatique***

**Président du jury : Monsieur Christian MERLE, Professeur de Pharmacie Galénique,
Faculté de Pharmacie, Nantes.**

**Membres du jury : Madame Hélène GAUTIER, Maître de Conférence en Pharmacie
Galénique, Faculté de Pharmacie, Nantes.**

**Monsieur Jean Michel BOULER, Maître de Conférence en Chimie
des Matériaux, Faculté de Chirurgie Dentaire, Nantes**

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ce travail au sein du Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Nantes en collaboration avec l'équipe INSERM 99-03.

Je tiens à remercier Monsieur Christian Merle pour m'avoir accueillie dans le Laboratoire de Pharmacie Galénique. Vous me faites également l'honneur de présider cette thèse, je vous en remercie.

Mes remerciements s'adressent en particulier à Madame Hélène Gautier. Vous m'avez dirigée au cours de ce projet avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité (y compris pendant vos vacances !). Vous m'avez fait découvrir l'univers de la Recherche et donnée l'envie de continuer dans cette voie. Je vous suis très reconnaissante de participer à ce jury.

Je remercie Anne Gouyette et Christophe Boiteux qui m'ont soutenue et conseillée tout au long de ce projet. Grâce à vous, j'ai pu mener à bien les analyses de porosité et les travaux de compression isostatique.

Je remercie l'équipe INSERM 99-03 et plus particulièrement, Monsieur Jean-Michel Boulter d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ce travail n'aurait pu se faire sans l'aide du Laboratoire de Chimie Analytique, où j'ai réalisé les nombreuses analyses spectrophotométriques. Je remercie Monsieur Yves Pegon et Denis.

L'IUT de Sciences et Génie des Matériaux de Carquefou, en particulier Madame Nicolazeau, ont accepté très gentiment de m'accueillir dans leur locaux le temps de quelques analyses. Je leur suis très reconnaissante de leur accueil.

Et j'adresse un grand merci à ma famille, Stéphane et Anaïg pour m'avoir soutenue tout au long de la rédaction de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	5
<u>I – PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	6
<u>1- SUBSTITUTS OSSEUX</u>	6
<u>a- Introduction</u>	6
<u>b- Rappels sur l'os</u>	7
<u>c- Matériaux de comblement osseux</u>	8
<u>d- Céramiques phospho-calciques</u>	10
<u>2- ASSOCIATION À UN PRINCIPE ACTIF</u>	13
<u>a- Intérêts</u>	13
<u>b- Applications</u>	13
<u>c- Notre choix : la vancomycine</u>	14
<u>1) Pourquoi associer la vancomycine?</u>	14
<u>2) Ou'est ce que la vancomycine ?</u>	15
<u>3) Mécanisme d'action</u>	16
<u>4) Résistance</u>	17
<u>3- MODE DE PRÉPARATION</u>	20
<u>a- Granulation</u>	20
<u>1) Principe</u>	20
<u>2) Association à un principe actif</u>	23
<u>b- Compression isostatique</u>	23
<u>c- Compaction dynamique</u>	25
<u>d- Frittage</u>	26
<u>4- COMMENT PROLONGER LA LIBÉRATION DE LA VANCOMYCINE ?</u>	27
<u>a- Effet de la mise en forme</u>	27
<u>b- Effets de la formulation</u>	28
<u>c- Choix de l'hydroxypropylméthylcellulose</u>	29
<u>1) Intérêt de l'association de l'HPMC</u>	30
<u>2) Comment agit l'HPMC au sein du mélange ?</u>	31
<u>a) Principe</u>	31
<u>b) Facteurs agissant sur la vitesse de libération</u>	33
<u>3) Comment associer l'HPMC?</u>	35
<u>5- CONCLUSION</u>	37

<u>II- PARTIE EXPERIMENTALE</u>	38
1- PRÉPARATION DU BCP	39
a- <u>Synthèse du CDA</u>	39
b- <u>Pré-granulation humide</u>	40
c- <u>Frittage</u>	40
d- <u>Caractérisation physico-chimique</u>	41
1) <u>Diffraction des rayons X</u>	41
2) <u>Spectrophotométrie infra-rouge</u>	42
2- FORMULATION DU SUBSTITUT OSSEUX	44
a- <u>Mélange de l'Hydroxypropylméthylcellulose au BCP</u>	44
b- <u>Rhéologie</u>	45
c- <u>Mélange avec la vancomycine</u>	48
d- <u>Compression isostatique</u>	50
e- <u>Caractérisation des compacts</u>	50
1) <u>Porosité</u>	50
2) <u>Dureté Vickers</u>	54
3- CINÉTIQUE DE LIBÉRATION	57
a- <u>Conditions opératoires</u>	57
b- <u>Cinétiques de libération du BCP non granulé et du BCP granulé</u>	58
c- <u>Cinétiques de libération pour les mélanges non granulés</u>	60
d- <u>Cinétiques de libération pour les mélanges granulés</u>	61
e- <u>Comparaison des cinétiques</u>	63
<u>III- DISCUSSION</u>	66
1- <u>CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE</u>	66
2- <u>RHÉOLOGIE</u>	66
3- <u>DURETÉ</u>	67
4- <u>POROSITÉ</u>	69
5- <u>CINÉTIQUE DE LIBÉRATION</u>	71
<u>CONCLUSION</u>	74
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	75
<u>ANNEXE I : RÉPARTITION DE LA POROSITÉ POUR CHAQUE ÉCHANTILLON</u>	83
<u>ANNEXE II : VALEURS NUMÉRIQUES DES COURBES DE LIBÉRATION</u>	88

INTRODUCTION

Les nombreuses études réalisées depuis 20 ans sur les céramiques de phosphate de calcium ont ouvert de nouvelles perspectives aux cliniciens pour l'utilisation des substituts osseux en chirurgie maxillo-faciale, ORL, neurochirurgie, odontologie et orthopédie. Les substituts osseux sont utilisés pour réparer les défauts osseux causés par la maladie, un traumatisme ou par un curetage chirurgical de l'os. Les autogreffes et les allogreffes offrent de faibles possibilités de comblement osseux. Les allogreffes sont limitées par la disponibilité des greffons et les risques de transmissions d'agents pathogènes. Quant aux autogreffes, la qualité et la faible quantité d'os disponible présentent des inconvénients non négligeables. De ce fait, les substituts osseux prennent une place de plus en plus importante dans le traitement des complements osseux.

Les céramiques phosphocalciques sont largement représentées dans ce domaine. La céramique est un matériau non métallique, non organique qui nécessite pour sa formation un traitement en pression (compaction dynamique, compression isostatique...) et en température (frittage).

Depuis toujours, le traitement d'infections osseuses pose de nombreux problèmes en médecine du fait de la faible pénétration des médicaments dans le tissu osseux. L'incorporation de principes actifs directement dans l'implant s'avère être une solution pour contourner cette difficulté, la diffusion du médicament se faisant directement *in situ*.

Notre étude porte sur le phosphate de calcium biphasé (BCP : *biphasic calcium phosphate*) constitué d'hydroxyapatite (HAp) et de phosphate tricalcique β (β -TCP : *tricalcium phosphate*) en proportions variables. Le principe actif associé à ce biomatériau, dans ce projet est un antibiotique de la famille des glycopeptides : la vancomycine. L'objectif précis de notre étude consiste à moduler la libération de vancomycine par adjonction d'un agent liant au BCP. C'est l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), un éther de cellulose qui a été choisi pour essayer de ralentir la libération de cet antibiotique.

Après une présentation générale des substituts osseux, nous aborderons plus en détail la vancomycine et l'hydroxypropylméthylcellulose. Dans un deuxième temps, la partie expérimentale présentera les différentes expérimentations réalisées au cours de cette étude.

I – PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Substituts osseux

a- Introduction

Les matériaux de comblement osseux sont depuis plusieurs années largement utilisés en orthopédie et odontologie. Ils sont souvent le seul recours pour reconstituer l'os lors de pertes osseuses qu'elles soient involontaires ou la conséquence d'une thérapie curatrice. A la suite d'accidents traumatiques, d'ostéomyélites ou d'ostéosarcome, l'os peut avoir du mal à se reformer. En effet, son renouvellement est difficile après de telles séquelles. Pour remédier à ce problème il existe différentes solutions thérapeutiques : la greffe osseuse ou l'utilisation de substituts osseux artificiels.

Parmi les greffes osseuses, il existe l'autogreffe et l'allogreffe. L'autogreffe est réalisée en prélevant au sujet lui-même un morceau d'os au niveau de la crête iliaque (os spongieux), de l'os du péroné ou des côtes : c'est la meilleure solution thérapeutique. Malheureusement, seules les petites pertes osseuses peuvent être traitées ainsi et il subsiste, malgré tout, quelques problèmes de morbidité, de qualité et de quantité d'os disponible.

L'allogreffe consiste à implanter de l'os issu d'une banque de donneurs. Cette possibilité est peu utilisée étant donné les nombreux risques infectieux qui existent, les problèmes de conservation des dons et de la perte du pouvoir ostéogénique lors de la greffe.

Pour pallier à ces problèmes de régénération osseuse, les matériaux de comblement osseux sont de plus en plus utilisés.

b- Rappels sur l'os

L'os humain (figure 1) est composé à 70% de matière minérale, c'est à dire d'une apatite phosphocalcique non stoechiométrique contenant un grand nombre d'éléments associés. Les ions hydrogénophosphates et les ions carbonates sont particulièrement importants. De nombreux autres ions se trouvent à l'état de traces au sein des cristaux d'apatite (ions potassium, fluorure, magnésium, sodium, chlorure...).

La formule la plus représentative de la composition minérale des tissus calcifiés (Legros, 1984) est donc celle d'une apatite, déficiente en ions calcium et contenant des ions hydrogénophosphates et des ions carbonates :



La composition de l'os dépend :

- de l'espèce,
- du sexe,
- de l'âge de l'os,
- de la partie de l'os,
- d'éventuelles pathologies.

Pour l'os périostique, on trouve en général des valeurs telles que $x = 0,95$ et $y = 0,72$. Il est montré également que la somme des $x + y$ reste sensiblement constante et égale à 1,7. Lors du vieillissement, la quantité d'ions carbonates augmente et la teneur globale en phosphore diminue. Le rapport calcium sur phosphore (Ca/P) augmente, mais la teneur relative en calcium reste constante (Legros, 1984).

La partie organique de l'os (30 %) est représentée par le collagène de type I à 95 %. Les 10% restant correspondent aux cellules et à des polysaccharides. Le rapport calcium sur phosphore de l'os est de 1,61.

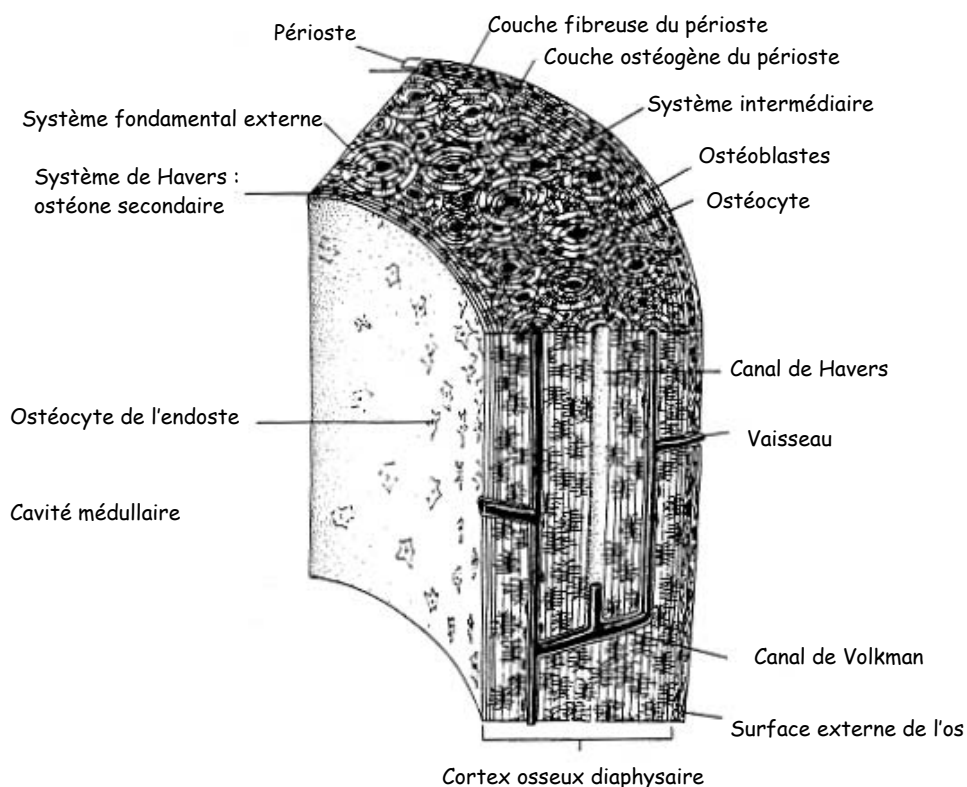


Figure 1: Organisation du tissu osseux (d'après Maillet, 1979)

c- Matériaux de comblement osseux

L'idée originale est de substituer l'os par un biomatériau qui serve de tuteur à la croissance osseuse. Le cahier des charges du biomatériau idéal de substitution osseuse est d'avoir un substitut :

- non cytotoxique, en raison de son implantation au contact des cellules de l'organisme humain,
- biocompatible, il doit être bien accepté par le milieu vivant,
- bioactif, c'est-à-dire que le matériau est capable de se transformer partiellement, par des interactions et des échanges avec les cellules et les tissus vivants,
- biodégradable, mais dans un délai permettant à l'os de se reformer,
- ostéoconducteur, il doit être capable de servir de tuteur à la régénération osseuse, donc de recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur en contact avec le biomatériau,
- ostéoinducteur, il peut induire la formation de l'os que ce soit en site osseux ou non,
- et ayant des propriétés mécaniques proches de celles de l'os (tableau 1), pour les substituts sous contraintes mécaniques

Parmi tous ces critères, seule l'ostéoinduction reste actuellement difficile à obtenir et à contrôler.

	Os cortical	Os spongieux
Contrainte à la rupture en compression : σ	150 MPa	1 à 7 MPa
Module d'élasticité (Young): E	18000 à 20000 MPa	70 à 80 MPa

Tableau 1: Propriétés mécaniques de l'os (d'après GESTO)

De nombreux matériaux (métaux, alliages, céramiques, polymères, composites...) ont été étudiés, mais ce sont les céramiques phosphocalciques qui ont montré leur plus grande efficacité. Elles sont notamment appréciées pour leur bonne biocompatibilité et leur bioactivité pour certaines d'entre elles. De plus, leur principal atout est d'avoir une structure physico-chimique proche de l'os. Par contre, elles disposent d'une faible résistance mécanique.

Les recherches s'orientent en parallèle vers des biomatériaux issus d'organismes vivants présents dans la nature tels que :

- Le corail (carbonate de calcium) (Fricain *et al.*, 2002) : il s'agit de l'exosquelette d'invertébrés, dont le principal intérêt est sa trame poreuse qui permet d'avoir des interconnexions entre les porosités et par conséquent une bonne ostéoconduction. Le corail est résorbable et il existe sous deux formes cristallines, la forme aragonite non traitée en température et la forme calcite qui a subi un traitement à haute température. Pour la calcite, la résorption est moins rapide et la porosité est modifiée, par contre le rapport Ca/P reste proche de celui de l'os humain. Le corail est utilisé en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale (Pouliquen *et al.*, 1989 ; Brasnu *et al.*, 1988).

- La nacre (Lamghari *et al.*, 1999) provient d'un mollusque bivalve : c'est un matériau non macroporeux, compact, constitué essentiellement de carbonate de calcium. Son utilisation présente un intérêt pour la substitution de tissus osseux compact surtout en chirurgie maxillo-faciale.

d- Céramiques phospho-calciques

Les céramiques phosphocalciques sont des sels de calcium de l'acide orthophosphorique. Elles ont été utilisées pour leur composition similaire à celle de l'os. Leur structure se rapproche de la structure apatitique de l'os. Le tableau 2 décrit les différents types de phosphate de calcium existants.

Formule	Nom	Abréviation	Ca/P
CaHPO_4	Phosphate dicalcique, Monérite	DCP	1
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Phosphate dicalcique dihydraté, Brushite	DCPD	1
$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Phosphate octocalcique	OCP	1,33
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique	TCP	1,5
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite	HAp	1,67
$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $0 < x < 1$, $n=0-2,5$	Hydroxyapatite déficiente	DHAp	1,5-1,67
$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Phosphate tétracalcique	TTCP	2

Tableau 2: Phosphates de calcium

Le phosphate tricalcique existe sous deux formes polymorphiques l' α -TCP et le β -TCP. Le mélange à proportion variable d'HAp et de β -TCP correspond au phosphate de calcium biphasé (BCP : *biphasic calcium phosphate*). Son rapport Ca/P varie en fonction de ces proportions. Les caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux sont variables. La solubilité des céramiques est inversement proportionnelle au rapport Ca/P et la biodégradation varie selon leur composition. Par exemple, l' α -TCP s'hydrolyse plus rapidement que le β -TCP ; et à porosité égale, le β -TCP est plus rapidement biodégradé que l'HAp.

L'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique et le phosphate de calcium biphasé (mélange d'HAp et de TCP à différents pourcentages) sont les phosphates de calcium les plus largement utilisés en tant que matériaux de comblement osseux (tableau 3). Les autres sont plus utilisés dans la fabrication des ciments orthopédiques.

β -TCP	HAp	BCP
Biosorb® (SBM)	<i>synthétiques</i>	MBCP® (Biomatlante)
Calcirosorb® (Ceraver)	Cerapatite® (Ceraver)	Calcirosorb 35® (Ceraver)
ChronOs® (Mathys)	Synatite® (SBM)	Eurocer® (FH Orthopedics)
	<i>biologiques</i>	Ceraform® (Teknimed)
	Endobon® (BlometMerck)	

Tableau 3: Exemples de céramiques phosphocalciques commercialisées en 2003

Après l'implantation, les céramiques phosphocalciques permettent à l'os de se régénérer plus facilement. Cependant, entre le BCP, l'HAp et le TCP, ce sont l'HAp et le BCP qui permettent une repousse osseuse plus efficace que le TCP. En effet le TCP, de part sa plus grande biorésorbabilité, ne permet pas à l'os de se reformer correctement. La résorption rapide de ce biomatériau entraînerait une acidification du milieu qui conduirait à une destruction de l'os nouvellement formé (Yuan *et al.*, 2001a).

La taille des pores de la céramique conditionne sa colonisation par les cellules osseuses. La classification de l'IUPAC (International Union for Pure Applied Chemistry) définit trois classes de porosité :

- les macropores de taille inférieure à 50 nm,
- les mésopores compris entre 2 μ m et 50 nm,
- les micropores de taille inférieure à 2 μ m.

Cependant dans le domaine des biomatériaux, la classification de l'IUPAC n'est pas retenue et trois autres classes sont communément utilisées :

- les micropores (diamètre inférieure à 10 μ m) : elle correspond aux espaces persistants entre les cristaux de biomatériaux,
- les mésopores ont un diamètre compris entre 10 et 100 μ m,
- les macropores ont un diamètre compris entre 100 et 500 μ m : ils correspondent à la taille nécessaire au passage de cellules dans le matériaux.

Cette deuxième classification nous servira de référence par la suite.

Les micropores sont propices à la diffusion des ions et des liquides physiologiques, tandis que les macropores favorisent la colonisation cellulaire osseuse. L'interconnexion entre les pores est primordiale pour faciliter la circulation des cellules et des fluides au travers de l'implant (Lu *et al.*, 1999). En effet, le substitut osseux doit permettre au tissu osseux de se former à l'interface de ces pores par le développement d'ostéocytes, d'ostéoblastes et de systèmes haversiens. Au contact des tissus vivants, il se forme à la surface des céramiques phosphocalciques une couche d'apatite carbonatée. Celle-ci se forme du fait que le produit de solubilité des phosphates de calcium est plus bas que celui des fluides biologiques. Une fois cette couche formée, les protéines viennent s'accumuler à la surface du biomatériau. L'os se forme à l'intérieur du substitut et se limite à la géométrie de l'implant et en aucun cas l'os ne se forme à côté de l'implant (non ostéoinducteur) (Yuan *et al.*, 2001b ; Rey *et al.*, 1990). Pour favoriser l'ostéoinduction, il faut associer au biomatériau des facteurs ostéogènes tels que les Bone Morphogenic Protein (BMP) ou des cellules souches (cellules ostéogéniques). De nombreuses études sont en cours à ce sujet (Nagao *et al.*, 2002).

2- Association à un principe actif

a- Intérêts

Les substituts osseux sont très souvent employés dans le cas de pertes osseuses engendrées par la maladie. Afin d'éviter un traitement par voie parentérale au patient, il est possible d'incorporer un principe actif au biomatériau pour envisager un traitement thérapeutique *in situ*. Le but final serait d'atteindre une libération prolongée sur plusieurs jours (la durée du traitement). Le terme anglo-saxon pour désigner cette forme galénique est le Drug Delivery System (DDS).

Le risque zéro en médecine n'existant pas, une opération chirurgicale est potentiellement sujette à une infection post-opératoire. Ces risques de fautes d'asepsie sont majorés en chirurgie orthopédique. L'ajout du principe actif antibiotique au substitut permettrait de traiter la maladie préexistante ou d'établir un traitement prophylactique pour éviter la survenue d'infections post-opératoires. De la même façon, il est envisageable d'associer au biomatériau des anticancéreux lorsqu'il s'agit de séquelles d'ostéosarcome. Il est également possible d'incorporer des facteurs de croissance qui engendrent une repousse osseuse plus rapide par le phénomène d'ostéoinduction.

b- Applications

L'incorporation d'un principe actif à une céramique phosphocalcique est très étudiée depuis une dizaine d'années. Plusieurs classes de médicaments sont envisagées. Parmi eux, se trouvent les antibiotiques : la vancomycine (Brouard *et al.*, 1997 ; Radin *et al.*, 1997 ; Gautier *et al.*, 2000a et 2000b ; Obadia *et al.*, 2002), la gentamicine (Bohner *et al.*, 1997 ; Brouard *et al.*, 1997), la polymyxine B (Kimakhe *et al.*, 1999), le sulfate d'isépamicine (Itokazu *et al.*, 1998b)... Ils sont associés pour traiter des pertes osseuses résultantes d'infections et/ou dans un but prophylactique. Les anticancéreux tels que le méthotrexate (Itokazu *et al.*, 1998a) et le cis-platine (Uchida *et al.*, 1992) sont utilisés pour traiter les cancers osseux, après résection des tumeurs ou en préventif pour éviter les métastases osseuses. De nombreux autres principes actifs peuvent être incorporés tels que les hormones stéroïdiennes, l'insuline (Bajpai & Benghuzzi, 1988), les hormones de croissance (Gautier *et al.*, 1998)...

Le but essentiel est de limiter les effets secondaires d'un traitement par voie systémique. Par exemple, l'incorporation *in situ* d'hormone de croissance permet d'éviter les effets secondaires sur le métabolisme lipidique, glucidique et hydrominéral (Gautier *et al.*, 1998). Le traitement *in situ* permet par la même occasion d'augmenter les doses. Dans certains cas, la céramique sert essentiellement de véhicule pour le médicament, on parle de DDS, le but principal n'étant pas de combler le défaut osseux, mais de délivrer le médicament localement. Actuellement, aucune céramique phosphocalcique n'est commercialisée avec dans sa formule un principe actif. Seuls les substituts osseux, utilisés comme ciment sont délivrés aux chirurgiens, avec en plus, un flacon de principe actif conditionné séparément (Cerafix®genta (CeraVer) : sulfate de calcium et gentamicine). C'est au clinicien d'effectuer l'incorporation de ce principe actif au moment de l'intervention chirurgicale. Il faut noter qu'un principe actif associé à un substitut osseux et commercialisé sous cette forme n'appartient plus à la catégorie des dispositifs médicaux, mais à la classe des médicaments. C'est d'ailleurs une des raisons qui ralentit la commercialisation de certains produits...

c- Notre choix : la vancomycine

Notre étude porte sur le phosphate de calcium biphasé (BCP). La vancomycine est l'antibiotique que nous avons choisi d'incorporer à ce substitut osseux. L'objectif final est de moduler la libération de l'agent thérapeutique par adjonction d'un agent liant : l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). La vancomycine présente un spectre d'activité intéressant pour une utilisation en orthopédie, mais son utilisation reste tout de même limitée suite à l'apparition de résistances.

1) Pourquoi associer la vancomycine?

L'efficacité de la vancomycine sur les souches de staphylocoques fait de cet antibiotique un candidat intéressant pour la chirurgie orthopédique. Son association au matériau de comblement osseux permet d'éviter ainsi une prise médicamenteuse par voie systémique. De plus, dans le cas d'infections osseuses, la dose est souvent augmentée en raison de la mauvaise pénétration de l'antibiotique dans l'os. Le substitut osseux chargé en antibiotique limiterait ainsi les risques d'effets secondaires induits par le médicament. La vancomycine diffuse *in situ* ce qui permet de dépasser la concentration minimale inhibitrice (CMI). A terme, le but est d'obtenir une diffusion de la vancomycine sur plusieurs jours afin de traiter une infection osseuse ou alors d'assurer un traitement prophylactique.

2) Qu'est ce que la vancomycine ?

La vancomycine est un antibiotique appartenant à la famille des glycopeptides. Les glycopeptides regroupent deux antibiotiques : la vancomycine et la téicoplanine. Ce sont des molécules de haut poids moléculaire (PM = 1450 Daltons pour la vancomycine, et PM = 1890 Daltons pour la téicoplanine) (Léone *et al.*, 2000). Les deux molécules comportent un noyau central peptidique de sept acides aminés (figure 2).

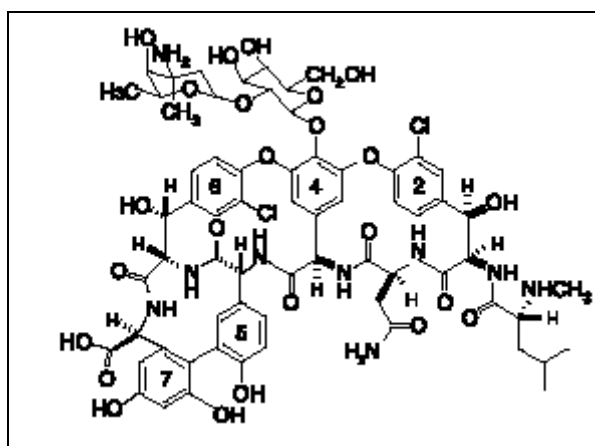


Figure 2: Structure chimique de la vancomycine (Allen *et al.*, 2003)

- D'après le Vidal, ouvrage de référence de prescription, la vancomycine est indiquée dans les cas :
 - d'infections sévères :
 - à staphylocoques, y compris staphylocoques résistants à la méticilline (SARM) (infections respiratoires banales, ostéites, endocardites, septicémies),
 - à streptocoques, (y compris entérocoques),
 - ou chez le sujet allergique au bêta-lactamines.

Elle est active seule ou en association avec les aminosides dans les endocardites à *Streptococcus viridans* ou *Streptococcus bovis*. Dans les endocardites à entérocoques, elle est associée à un aminoside.

- La vancomycine est également utilisée en prophylaxie des infections post-opératoires dues à des bactéries à Gram positif en :

- chirurgie cardiaque et vasculaire,
- neurochirurgie,
- chirurgie orthopédique avec implantation de matériel prothétique,

ou en cas de :

- réintervention chirurgicale précoce,
- colonisation démontrée ou prévisible par des staphylocoques résistants à la méticilline (SAMR),
- allergie aux bêta-lactamines.

3) Mécanisme d'action

Les glycopeptides ont trois mécanismes d'action :

- l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (constituant principal des bactéries à Gram positif) qui conduit à une lyse bactérienne,
- l'inhibition de la synthèse d'ARN,
- et l'altération de la perméabilité membranaire.

Le premier mécanisme est commun aux deux antibiotiques de la famille. Quant aux deux derniers mécanismes, ils sont utilisés par la vancomycine uniquement.

L'action bactéricide est lente entre 24 à 48 heures, et temps dépendant. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est basse : de 0,5 à 4 mg.L⁻¹. La vancomycine est inactive sur les bactéries à Gram négatif, car la molécule est trop volumineuse pour emprunter les pores de la membrane externe et ne peut pas atteindre le peptidoglycane.

N'étant pas absorbée *per os*, la vancomycine s'administre uniquement par voie intra-veineuse, (la forme orale commercialisée par le laboratoire Lilly, Vancocine® 500mg/6mL, ayant comme indication la décontamination de l'oropharynx, est supprimée depuis début 2002).

L'élimination se fait par filtration glomérulaire (Léone *et al.*, 2000).

D'après le comité de l'antibiogramme (communiqué 2003), la vancomycine est dite :

- sensible si $CMI \leq 4 \text{ mg.L}^{-1}$,
- intermédiaire si $4 < CMI \leq 16 \text{ mg.L}^{-1}$,
- résistante si $CMI > 16 \text{ mg.L}^{-1}$.

4) Résistance

Une des indications de la vancomycine, est de traiter les infections sévères à staphylocoques et à streptocoques lorsque les autres antibiotiques habituellement prescrits sont inefficaces. Elle est utilisée seule ou en association.

Jusqu'il y a une dizaine d'années, peu de résistances étaient apparues depuis la commercialisation de la vancomycine en 1960 (Léone *et al.*, 2000). Depuis, de plus en plus de bactéries résistantes à la vancomycine ont été observées, ce qui pose un problème dans le choix de l'alternative thérapeutique et pour les mesures à mettre en oeuvre afin de limiter cette résistance. En effet, il n'existe aucun antibiotique actif contre les souches cocci à Gram positif résistantes à la vancomycine (Kremmery & Setton, 2000). En mars 1999, 70 à 80 % des souches à *Staphylococcus aureus* sont déclarées résistantes à la pénicilline, déjà depuis 1980 de plus en plus de souches étaient résistantes à la méticilline. Plus récemment, entre 1990 et 2000 la résistance à la méticilline est passée de 20-25 % à 40 % à l'hôpital (Raymond *et al.*, 2001).

Les entérocoques sont les premières souches de bactéries résistantes à la vancomycine qui sont apparues. Ces entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont isolés pour la première fois en France en 1986 (Leclercq, 1997). L'utilisation massive de la vancomycine aux USA et la supplémentation animale par un antibiotique proche de la vancomycine (avoporcine) en Europe seraient à l'origine de ces résistances. Ces ERV sont transmis par contact direct aux patients ou par le personnel de santé (Ries, 2001).

Le premier rapport clinique traitant de la résistance des entérocoques à la vancomycine fut publié en 1988 par Uttley *et al.*. Depuis, plusieurs phénotypes de résistance ont été identifiés. Parmi eux, trois types de résistances sont acquises (VAN A, VAN B et VAN D), et un type de résistance est intrinsèque (VAN C1, VAN C2 et VAN C3).

Les phénotypes décrits ont les caractéristiques suivantes :

- Le gène VAN A : il induit une haute résistance et est situé sur un transposon qui peut être facilement échangé entre les souches d'entérocoques et différentes espèces par conjugaison ($\text{CMI} > 64 \text{ mg.L}^{-1}$).
- Le gène VAN B : la résistance induite est moyenne, le gène se situe souvent sur un gène chromosomique, mais il peut être également transféré par conjugaison. ($\text{CMI} > 4 \text{ mg.L}^{-1}$).
- Les gènes VAN C1, C2, C3 : la résistance est de faible intensité, elle est portée par un gène chromosomique non transférable ($2 < \text{CMI} < 32 \text{ mg.L}^{-1}$).
- Le gène VAN D ($\text{CMI} = 64 \text{ mg.L}^{-1}$) est rarement identifié.

VAN A et VAN B sont inductibles, ils présentent un risque élevé de contamination. VAN C1, C2, C3 et D sont constitutifs. L'explication de cette résistance dérive directement du mécanisme d'action de la vancomycine. Les précurseurs de peptidoglycannes contenant les polypeptides issus de ces phénotypes ont une affinité réduite pour la vancomycine. La synthèse de la paroi bactérienne est modifiée, l'antibiotique ne peut plus inhiber la synthèse de ces peptidoglycannes, ce qui empêche l'action bactéricide de la vancomycine (Léone *et al.*, 2000).

Dès 1995 aux USA, le « Hospital Infection Control Practices Advisory Committee » (HICPAC) a établi des recommandations pour la prévention de la diffusion de la résistance à la vancomycine. Le HICPAC décrit notamment les cas où la vancomycine doit être utilisée avec précaution, et les cas où son utilisation doit être découragée.

Durant ces dernières années le pourcentage d'infections à ERV a largement augmenté notamment aux USA où de 1989 à 1993, en milieu hospitalier, ces infections représentaient de 0,3 % à 7,9 % tous services confondus. En Corée de 1997 à 1998, les infections nosocomiales à ERV sont passées de 0,7 à 7,3 %. En Allemagne 16,3 % de portage sont répertoriés parmi les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs d'un hôpital universitaire (Talon *et al.*, 2001). Etrangement, la fréquence de portage d'ERV chez les sujets sains et hospitalisés en France est très faible. En effet, en Europe, les gènes de résistance seraient apparus dans un réservoir animal et dans la population saine. Par contre, aux USA, ces gènes sont apparus dans les maladies nosocomiales avec une large dispersion au sein des patients hospitalisés (Bonten *et al.*, 2001)

De nombreux transferts de gène de résistance ont été réalisés ces dernières années *in vitro*. En 1989, Leclerc *et al.* ont transféré VAN A d'entérocoques à *Listeria monocytogenes* et à *Streptococci*. En 1990, Brisson-Noel *et al.* ont transféré VAN A à *Bacillus spp.* En 1992, Noble a transféré le même gène aux staphylocoques.

En mai 1996 est apparu le premier cas d'infection dû à une souche *Staphylococcus aureus* avec une résistance intermédiaire à la vancomycine. Le 18/02/1999, le New England Journal of Medicine présente trois nouveaux cas d'infections, cette fois-ci mortelles, à *Staphylococcus aureus* (Smith *et al.*, 1999 ; Sieradzki *et al.*, 1999). Depuis plusieurs cas de *S.aureus* résistants à la vancomycine (SARV) ont été observés aux USA, en France, en Corée, en Afrique du sud et au Brésil (Hiramatsu, 2001). Apparemment, cette nouvelle résistance n'utilise pas le même mécanisme que les entérocoques (Hiramatsu, 2001). Il n'y a pas d'implication des phénotypes VAN et les causes de cette résistance sont multifactorielles. La résistance est due à un excès de la synthèse de la paroi qui aboutit à son épaissement, empêchant ainsi l'action bactéricide de la vancomycine (Hiramatsu, 2001).

Actuellement, les recherches se poursuivent pour développer de nouveaux antibiotiques efficaces sur ces souches résistantes. Parmi eux, on peut citer deux antibiotiques qui disposent d'une puissante activité *in vitro* contre les bactéries à Gram positif, y compris celles résistant par des mécanismes naturels ou acquis aux glycopeptides habituels. Il s'agit de la quinupristin/dalfopristin (Synercid®) (Aeschlimann & Rybak, 1998) ; et de l'oritavancin (LY 333328) (Fromtling & castaner, 1998). Cette deuxième molécule est un nouveau glycopeptide en cours de commercialisation par Lilly & Co (essais cliniques de phase III) (Allen *et al.*, 2003). Cependant, dans l'attente de résultats satisfaisants *in vivo*, l'utilisation rationnelle de ces antibiotiques, la prise de précautions afin de prévenir la transmission de ces souches et l'identification de ces souches de résistantes sont les seules précautions à prendre par les praticiens.

3- Mode de préparation

Les substituts osseux se présentent sous plusieurs formes : les blocs, les granules et la forme injectable (IBS : *injectable bone substitute*) (Daculsi, 1998 ; Weiss *et al.*, 1999), selon la méthode de fabrication utilisée.

L'incorporation d'un principe actif (PA) à un phosphate de calcium nécessite plusieurs précautions particulières. Les principaux PA médicamenteux décrits précédemment sont stables dans certaines conditions et potentiellement dégradés sous l'effet de la température, de l'humidité... Or le mode de mise en forme habituelle des céramiques est le frittage. Ce procédé utilise un traitement thermique à haute température, il n'est donc pas applicable à un phosphate de calcium contenant un principe actif. De ce fait, il convient de choisir d'autres méthodes non destructrices pour le principe actif. Plusieurs méthodes sont envisagées pour incorporer un principe actif à un phosphate de calcium : la granulation, la compression isostatique et la compaction dynamique.

a- Granulation

1) Principe

La granulation est un procédé de densification très largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la fabrication des comprimés. Le but est d'obtenir à partir d'un mélange de poudre une répartition homogène dans chaque granule des différents constituants.

La granulation permet notamment d'éviter la ségrégation des constituants dans le mélange. En effet, les différences de taille ou de masse volumique des composants entraînent la migration des petites particules à la base du récipient, tandis que les grosses particules restent dessus. Il convient également d'éviter une large distribution de taille des granules eux-mêmes : cela pourrait conduire à la formation d'agglomérats. Le danger majeur par la suite est une mauvaise répartition du principe actif, entraînant un risque de sous-dosage ou de sur-dosage médicamenteux. De plus, la granulation permet d'améliorer les propriétés d'écoulement d'un mélange, et d'augmenter la qualité de la compression du mélange lors de la fabrication de comprimés.

Il existe deux types de granulation : la granulation sèche et la granulation humide. Seule la seconde nous intéresse ici. La poudre est tout d'abord mélangée à un solvant jusqu'à obtenir une masse légèrement humidifiée. Dans une seconde étape, cette masse humide est incorporée à un granulateur oscillateur qui force la poudre à passer au travers d'un tamis. Les granules humides sont récupérés à la sortie du tamis. Ils sont ensuite séchés à l'étuve. L'eau fait partie des solvants les plus couramment utilisés. La granulation humide ne s'applique qu'aux PA non dégradés par le solvant utilisé.

▪ *Mécanismes de liaisons des particules.*

Les liaisons formées entre les particules de poudre permettent la formation des granules, mais elles doivent être suffisamment fortes pour éviter l'éclatement de ce granulé. Rumpf (1962) a distingué plusieurs types de liaisons entre les particules :

- des forces d'adhésion et de cohésion dues au film liquide immobile,
- des forces interfaciales dues au film liquide mobile,
- des ponts solides,
- des forces attractives entre les particules solides,
- des forces attractives telles que les forces de Van Der Waals et les forces électrostatiques.

Newitt et Conway-Jones (1958) avaient déjà définis trois états de distribution du liquide entre les particules. Avec un taux d'humidité croissant, ils ont observé successivement (figure 3) :

- l'état pendulaire, (l'adhésion du liquide est due à la tension superficielle de l'interface liquide-air et la pression hydrostatique dans le pont liquide),
- l'état funiculaire,
- l'état capillaire, (tout l'air est déplacé entre les particules, seule l'interface liquide-air en surface du granule persiste).

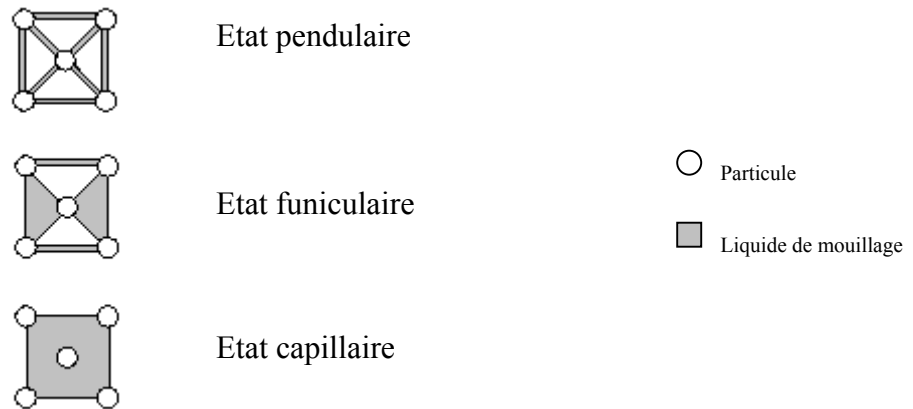


Figure 3: Etapes de distribution du liquide entre les particules (d'après Newitt & Jones, 1998)

L'état pendulaire permet de densifier la masse humide, le volume des pores occupé par l'air diminue et peut produire l'état funiculaire ou capillaire sans addition d'autre liquide. Il est important de stopper la granulation avant la formation d'une masse humide coalescente.

▪ ***Mécanismes de formation des granules.***

Barlow en 1968 décrit trois étapes nécessaires à la formation des granules :

- La nucléation.

La granulation commence par l'état pendulaire. L'agitation densifie cet état, on passe à l'état capillaire. Il se forme les nuclei qui favorisent la croissance des granules.

- La transition.

Les nucléi grossissent par deux mécanismes : chaque petite particule peut être ajoutée aux nucléi par des ponts pendulaires, ou plusieurs nuclei peuvent se combiner. Cet état de transition est caractérisé par la présence d'un grand nombre de petits granules avec une large distribution des tailles.

- La croissance des granules.

La taille des granules augmente, ils deviennent sphériques. Si l'agitation se poursuit, il risque d'y avoir une coalescence des granules, on obtient alors une masse inutilisable. La croissance des granules se fait par coalescence de plusieurs granules en un granule plus gros ; ou par la rupture de granules en fragments qui adhèrent ensuite à d'autres granules ; ou bien par le transfert des produits d'abrasion, (dû à l'attrition des granules causé par l'agitation) sur d'autres granules (Aulton, 1988).

2) Association à un principe actif.

La méthode de granulation humide permet d'obtenir des granules. Le principe actif est associé soit en l'incorporant au liquide de mouillage qui permet la granulation humide, soit en plongeant les granules formés dans une solution de l'agent thérapeutique (Gautier *et al.*, 2001 ; Obadia *et al.*, 2003). La forme granule peut être utilisée telle quelle pour combler un défaut osseux. Elle présente l'avantage de remplir parfaitement l'espace sans avoir besoin d'usiner un bloc. Cette forme peut également servir de base à d'autres formes (blocs).

b- Compression isostatique

La compression isostatique est une technique de mise en forme qui permet la consolidation d'un matériau en lui appliquant une pression transmise uniformément dans toutes les directions. L'échantillon est placé sous vide dans une enveloppe élastique, étanche. Le tout est immergé dans une cuve remplie d'un fluide qui assure la compression isostatique. La pression appliquée est obtenue par une pompe à haute pression (figure 4).

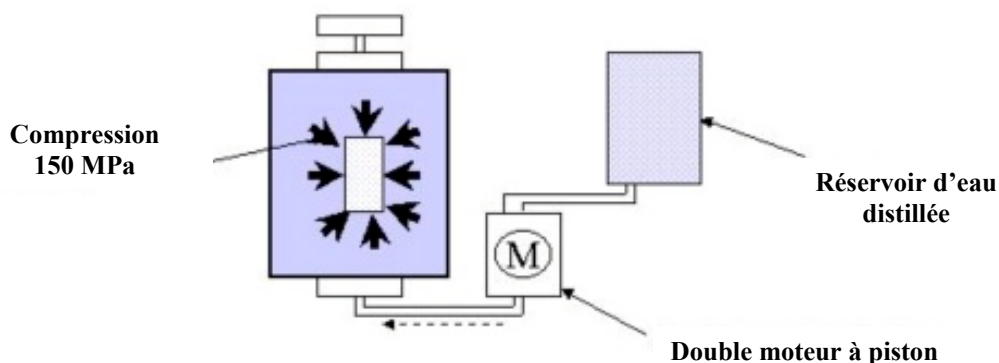


Figure 4 : Principe de la compression isostatique

Ce procédé a quelques applications dans la stérilisation en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Les hautes pressions entraînent la destruction des liaisons non covalentes, hydrophobes et ioniques (Balny *et al.*, 1992). Cette propriété leur permet d'avoir une action virucide, bactéricide...d'où son application en stérilisation.

D'un point de vue de la mise en forme, le principe actif peut être associé directement aux mélanges de poudres à compacter : ce procédé met en forme le biomatériau sans détérioration de l'agent thérapeutique. Une étude conduite sur l'association de vancomycine au phosphate de calcium biphasique n'a montré aucune dégradation des constituants pour une pression allant jusqu'à 200 MPa (Gautier *et al.*, 2000a) . Ces résultats sont validés par des analyses de spectrophotométrie infra-rouge et de diffraction des rayons X effectués sur le BCP, ainsi que des analyses de résonnance magnétique nucléaire (RMN) réalisées sur la vancomycine (Gautier *et al.*, 2000a et 2000b). De même, l'activité biologique de la vancomycine est maintenue après une compression isostatique de 150 MPa pendant une minute (Obadia *et al.*, 2003) . Ce procédé permet d'obtenir des blocs.

c- Compaction dynamique

La compaction dynamique (figure 5) se fait grâce à l'impact d'un projectile à la surface de la poudre pré-compressée. C'est un procédé innovant, qui permet de produire des liaisons interparticulaires en une seule étape au cours du choc. Le frittage est inutile.

D'après les analyses de diffraction des rayons X et de spectrophotométrie infra-rouge, il n'y a pas de modification physico-chimique de la structure du BCP. La vancomycine ne présente également aucune modification d'après les analyses RMN de la molécule (Gautier *et al.*, 2001). Ces analyses ont été réalisées avant et après une compaction dynamique de 1,9 MPa. De plus, l'activité de la vancomycine est maintenue après compaction avec une vitesse d'impaction de 39 m.s^{-1} (Obadia *et al.*, 2003). D'autres essais réalisés sur de l'apatite déficiente en calcium (CDA : *calcium deficient apatite*) et de la polymyxine B confirment les résultats précédents. Il n'y a pas eu de modification de la cristallinité et de l'environnement ionique du CDA et aucune modification de la structure de la polymyxine n'est observée. Cependant, une partie de l'activité biologique de l'antibiotique a disparu. Ces analyses sont effectuées avant et après une compaction à 0,5 et 2 MPa, soit 25 et 50 m.s^{-1} (Kimakhe *et al.*, 1999). De la même façon, après la compaction du BCP et de la vancomycine, seulement 28 % de la vancomycine est retrouvée active. Une des hypothèses émises serait la destruction de l'activité par la brève augmentation de la température (non quantifiable) au cours du choc. D'autre part, la pression appliquée lors de la compaction dynamique n'a pas d'influence significative sur les temps de libération de la vancomycine associé au BCP, pour une pression allant de 1,1 MPa et 1,9 MPa (Gautier *et al.*, 2001). Par contre, Kimakhe *et al.* (1999) ont observé une augmentation des temps de libération pour les échantillons soumis à 0,5 MPa en comparaison à ceux soumis à une pression de 2 MPa. Cette méthode permet l'obtention de blocs.

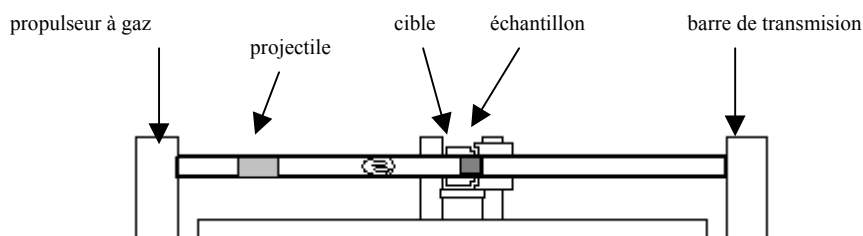


Figure 5 : Schéma de la compaction dynamique (d'après Obadia *et al.*, 2003)

d- Frittage

Cette opération consiste à agglomérer des particules entre elles, par traitement thermique, pour obtenir un solide cohérent. Le frittage consolide une poudre à une température inférieure à la température de fusion du composé. La composition chimique en calcium et phosphore, et les caractéristiques structurales des céramiques phosphocalciques dépendent des conditions de frittage.

Le frittage est une opération physico-chimique qui permet de passer de la poudre à la céramique. C'est au cours de cette étape que se forme la microstructure du matériau. Deux phénomènes importants ont lieu lors du frittage : la densification et la croissance granulaire. Lors de la montée en température, les grains commencent d'abord par se rapprocher les uns des autres. Ensuite, commence la diffusion chimique qui va permettre de créer les joints de grains. A ce stade, le matériau se tient, mais il reste toujours très poreux. Si on poursuit le traitement thermique, la porosité diminue et la céramique se densifie et enfin la croissance granulaire apparaît au détriment de la densification. Il est très important de déterminer les conditions du traitement thermique (montée et descente en température, et durée) à appliquer au matériau, car il conditionne la dureté, le maintien et la porosité de la céramique. Le traitement préalable des grains a également son importance : une poudre homogène conduit à une meilleure densification qu'une poudre agglomérée.

Pour un substitut mis en forme par frittage, le principe actif ne peut pas être associé avant cette étape car il serait dégradé. Il existe donc plusieurs solutions pour associer le PA. Une des techniques fréquemment utilisées pour incorporer le principe actif au biomatériau consiste à faire absorber le PA à la céramique en plongeant celle-ci dans une solution de PA (Prat-Poiret *et al.*, 1996 ; Brouard *et al.*, 1997). Malheureusement, cette technique ne permet pas la pénétration de l'agent thérapeutique en profondeur (Gautier *et al.*, 2000b). Au contraire, l'incorporation sous vide et la centrifugation favorisent la pénétration du PA entre les pores de la céramique. Les études faites sur l'adsorption montrent qu'elle est concentration dépendante, mais indépendante du temps d'immersion (Brouard *et al.*, 1997 ; Itokazu *et al.*, 1998b).

4- Comment prolonger la libération de la vancomycine ?

L'incorporation de la vancomycine au phosphate de calcium doit permettre une libération contrôlée de l'antibiotique au cours du temps afin de prétendre à son efficacité (l'action bactéricide est lente, entre 24 et 48 heures, et temps dépendant). De plus, un relargage excessif du principe actif au cours des premières heures pourrait s'avérer potentiellement toxique pour le patient. Il y aurait un risque de diffusion de la vancomycine dans la circulation générale ; et surtout le traitement prophylactique ne pourrait être envisagé. Il paraît donc important de pouvoir prolonger cette libération, soit en ajoutant un agent liant dans la formulation et/ou en choisissant une méthode de mise en forme qui assure une libération prolongée. Plusieurs options sont envisagées pour ralentir la libération de principe actif.

a- Effet de la mise en forme

La granulation, la compression isostatique et la compaction dynamique sont des procédés de mise en forme qui ont déjà à eux seuls une influence sur le profil de libération du principe actif associé. En effet, la comparaison des profils de libération obtenus avec ces différentes méthodes de mise en forme montre des résultats assez différents. D'après Gautier *et al.*, l'essai de libération, réalisé sur un substitut à base de BCP chargé en vancomycine donne les meilleurs résultats pour la compression isostatique avec une libération de l'antibiotique allant jusqu'à 7 jours (Gautier *et al.*, 2000b), contre 6 jours pour la compaction dynamique et 3 jours pour la granulation humide (Gautier *et al.*, 2001). Quant aux temps obtenus par les autres méthodes, ils sont encore plus brefs. Brouard (1997) a étudié la libération de la vancomycine, cette fois-ci à partir du phosphate tricalcique β en utilisant l'adsorption. Le relargage obtenu est bref et massif, puisque 67 % de vancomycine est libérée en 4 heures et la totalité en 20 heures.

Les divergences observées entre les temps de libération sont dues à la création de liaisons plus fortes entre le principe actif et le phosphate de calcium, dans le cas de la compression isostatique et de la compaction dynamique, contrairement aux autres méthodes : la granulation et les techniques d'adsorption. De même, l'augmentation de la force de compression de 100 à 200 MPa a permis de prolonger la période de libération de la vancomycine (Gautier *et al.*, 2000b). Les mêmes résultats sont obtenus avec la compaction dynamique. Cette méthode appliquée à de l'apatite déficiente en calcium (CDA : *calcium deficient apatite*) préalablement chargée en Polymixine B par adsorption a permis de prolonger la libération de l'antibiotique de 2 à 5 jours pour une pression appliquée allant de 0,5 à 2 MPa (Kimakhe *et al.*, 1999). Gautier *et al.* (2001), quant à eux n'avaient pas observé de différence significative entre une pression de 1,1 et 1,9 MPa. Kimakhe *et al.* ont attribué ce résultat à la formation de liaisons entre le CDA et l'antibiotique et à l'influence de la dureté du bloc (dû à une augmentation de la densité du bloc sous la force appliquée).

b- Effets de la formulation

Dans le cadre de la formulation d'un ciment, Bohner *et al.* (2000) ont envisagé l'association d'un polyacide acrylique (PAA) au phosphate dicalcique dihydraté pour ralentir la libération de la gentamicine. La libération est d'autant plus prolongée que la concentration et le poids moléculaire du PAA augmentent. La libération est ralentie jusqu'à 7 jours par la formation d'un gel entre le sulfate de gentamicine et le PAA. Yaylaoglu *et al.* (1999) ont associé de la gélatine à de l'hydroxyapatite. Radin *et al.* (1997) ont montré que la libération de la vancomycine à travers des pores d'hydroxyapatite, recouvrant des disques en alliage de titane, est ralentie si un enrobage sous forme de lipides est rajouté sur l'HAp. La libération s'est prolongée jusqu'à 72h contre 24 heures auparavant, sans la surcouche de lipides. De même, d'autres paramètres tels que le volume des blocs utilisés et leur densité respective jouent un rôle dans la cinétique de relargage de l'agent thérapeutique associé. En effet, la libération est d'autant plus ralentie que les blocs sont volumineux et qu'ils ont une densité élevée (Prat-Poiret *et al.*, 1996). De plus, la porosité et surtout la répartition en macropores et micropores tiennent une place importante dans le chargement en PA. Une forte porosité et un nombre élevé de macropores permettent de charger plus le biomatériau et de libérer de fortes concentrations de PA. L'agent thérapeutique se loge dans les macropores et diffuse dans la céramique grâce au réseau de micropores créant des interconnexions au sein du matériau (Bohner *et al.*, 1997 ; Brouard *et al.*, 1997 ; Itokazu *et al.*, 1998a).

c- Choix de l'hydroxypropylméthylcellulose

L'agent liant que nous avons choisi de tester dans cette étude est l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC).

L'HPMC est un éther de la cellulose, polymère le plus abondamment représenté dans la nature. Ce produit, largement utilisé comme additif alimentaire, est reconnu par la FDA et la US Food. L'HPMC est utilisé comme excipient pharmaceutique, il est inscrit à la Pharmacopée Européenne et Américaine.

L'HPMC est aussi nommé hypromellose et E 464. Il est défini comme une cellulose partiellement O-méthylée et O-(2-hydroxypropylée) (figure 6), il se caractérise sous forme de poudre ou de granules blancs, blanc-jaune ou blanc-gris, hygroscopiques après dessiccation. Il est pratiquement insoluble dans l'eau chaude, dans l'acétone, dans l'éthanol, dans l'éther et dans le toluène. L'hypromellose se dissout dans l'eau froide en donnant une solution colloïdale.

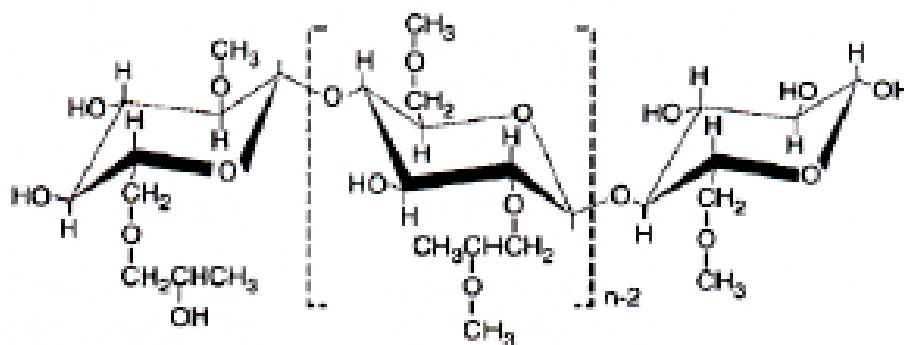


Figure 6: Structure chimique de l'hydroxypropylméthylcellulose (Dow Chemical Company, Colorcon).

L'HPMC possède différentes fonctions (Harwood, 2000), il est notamment utilisé comme :

- agent d'enrobage,
- agent filmogène,
- agent stabilisant,
- agent de suspension,
- liant des comprimés,
- épaississant.

Plusieurs types d'HPMC sont définis en fonction de leur pourcentage en substituants méthoxyles et hydropropoxyles (tableau 4). Chaque polymère s'hydrate à une vitesse plus ou moins rapide selon la proportion des différents constituants. Il existe plusieurs viscosités pour chacun des types d'HPMC. Pour tous types d'HPMC confondus, la viscosité s'étale de 3 à 100000 mPa.s, elle est mesurée pour une solution de 2 % à 20°C par un viscosimètre Ubbelohde (viscosimètre à capillaire). Il est important également de noter que la masse moléculaire et la viscosité du polymère sont directement liées.

Ces propriétés intéressantes font de l'HPMC un matériau utilisé dans de nombreuses applications. Il est notamment très employé dans l'industrie pharmaceutique pour la formulation de comprimés matriciels solubles. La matrice d'HPMC permet une libération prolongée du PA associé (Colorcon, Dow Chemical Company).

Produit	% de substituants méthoxyles	% de substituants hydroxypropyles	vitesse d'hydratation relative	Dénomination USP	Viscosités (mPa.s)
Methocel K Premium®	19-24	7-12	très rapide	2208	100, 4000, 15000, 100000
Methocel E Premium®	28-30	7-12	rapide	2910	3, 5, 6, 15, 50, 4000, 10000
Methocel F Premium®	27-30	4-7,5	moyenne	2906	50, 4000

Tableau 4 : Gamme d'HPMC commercialisée par Colorcon, Dow Chemical Company.

1) Intérêt de l'association de l'HPMC

Les matrices hydrophylles sont déjà largement utilisées pour contrôler la libération des formes orales médicamenteuses. Dans leur formulation, l'HPMC est ajoutée sous forme de poudre. Le mélange peut ensuite être granulé, puis compressé pour former le comprimé. Plusieurs polymères hydrophiles sont utilisés, mais c'est avec l'HPMC que les meilleurs résultats sont obtenus. D'autres polymères, tels que la carboxyméthylcellulose (CMC) et l'hydroxypropylcellulose (HPC), sont employés dans les systèmes matriciels, mais des études ont montré qu'ils ne sont pas hydratés assez vite pour protéger le comprimé de sa rapide désintégration et de sa dissolution au contact de l'eau (Alderman, 1984). La libération prolongée d'un principe actif à partir de systèmes matriciels fait l'objet de nombreuses recherches (Alderman, 1984 ; Robert *et al.*, 1995 ; Gao & Meurey, 1996 ; Bettini *et al.*, 1998, 2001 ; Colombo *et al.*, 1999 ; Siepmann *et al.*, 2002).

Devant cette utilisation massive de l'HPMC pour produire des formes à libération prolongée, il est apparu intéressant d'utiliser cet agent liant dans notre formulation de façon à prolonger la libération du PA associé à la céramique phosphocalcique. De plus, d'après les études de spectrophotométrie infra-rouge, de diffraction des rayons X et de microscopie électronique à balayage, il n'existe aucune interaction entre l'HPMC et les phosphates de calcium (DCPD, CDA, et BCP) (Dorozhkin, 2001). L'association d'HPMC au BCP peut donc être envisagée sans qu'il n'y ait de modification au niveau des propriétés physico-chimiques de ces phosphates de calcium.

2) Comment agit l'HPMC au sein du mélange ?

a) Principe

Dans le cas de comprimés formulés avec de l'HPMC, la mise en contact de ce comprimé avec les liquides physiologiques conduit aux étapes de mouillage du polymère, d'hydratation et de dissolution.

En effet, c'est seulement au contact des fluides biologiques que le gel d'HPMC se forme. L'eau pénètre à l'intérieur du comprimé, il s'établit un gradient de concentration d'eau à l'interface matrice /eau, puis l'eau commence à imbiber le système. A ce moment là, la conformation spatiale des chaînes du polymère change, elles s'éloignent les unes des autres, ce qui entraîne une expansion du volume (gonflement). Ce changement de conformation conduit à une diminution de la concentration du polymère et de ce fait une augmentation de la mobilité des macromolécules (Alderman, 1984 ; Robert *et al.*, 1995 ; Bettini *et al.*, 2001). Selon la longueur des chaînes et le degré de substitution du polymère utilisé, l'HPMC se dissout plus ou moins rapidement (Siepmann *et al.*, 2002).

Les dimensions du système augmentent au fur et à mesure que l'eau pénètre. Le PA peut commencer à se dissoudre et à diffuser hors du système (Rabadhi-Siahboui *et al.*, 1994 ; Siepmann *et al.*, 2002). La formation du gel d'HPMC et le comportement du noyau du comprimé sont différents si on se place dans le plan axial ou radial du comprimé. La formation du gel d'HPMC autour du noyau du comprimé se fait à la même vitesse et à la même épaisseur pour tous les types d'HPMC (dans le plan radial ou axial du comprimé).

Une différence est observée concernant le comportement du noyau du comprimé. Les dimensions du noyau en coupe radial diminuent tandis qu'en axial elles augmentent. Ce rétrécissement en radial est plus marqué pour l'HPMC type 2208 (dénomination USP, tableau 4) que pour les types 2910 et 2906. Ceci s'expliquerait par une hydratation plus rapide de la matrice hydrophile dans le cas du type 2208 (Rabadhi-Siahboumi *et al.*, 1994).

Au cours de la formation du gel d'HPMC, trois fronts différents se distinguent (figure 7) :

- Le front de gonflement : il sépare le polymère juste humidifié de l'état déjà gélifié.
- Le front de dissolution : il détermine la zone où le principe actif est non dissout de la zone où il est déjà dissout.
- Le front d'érosion : c'est la zone où la matrice commence à se dissoudre.

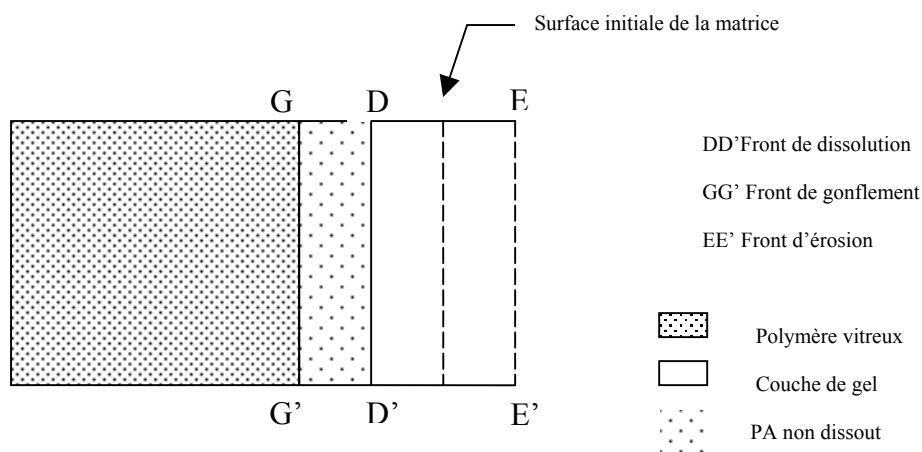


Figure 7 : Représentation schématique des différentes zones (d'après Zema *et al.*, 2000)

Dans la couche de gel (à partir du front de gonflement), la proportion de particules de PA non dissoutes dépend de la solubilité de ce PA dans le gel (Zema *et al.*, 2000). La couche de gel a un rôle important dans le contrôle de la libération de ces matrices. Les cinétiques de libération, à partir d'un système matriciel, dépendent de la dissolution du PA dans le gel, de sa diffusion, de la relaxation des chaînes du polymère et de l'érosion de la matrice. Ces quatre phénomènes combinés déterminent le gradient de concentration du PA. Celui-ci se forme entre le front de dissolution et le front d'érosion (Colombo *et al.*, 1996).

Pour les systèmes où l'érosion de la matrice est lente, la couche de gel entre le front de dissolution et le front d'érosion peut être considérée comme une phase homogène où la 2^{ème} loi de Fick peut être appliquée au PA. Cette loi définit le transport de matière par suite d'un gradient de concentration en fonction du temps. On parle dans ce cas d'un transport de masse au travers du gel (membrane) (Zema *et al.*, 2000).

b) Facteurs agissant sur la vitesse de libération

Dans l'étude des systèmes matriciels des comprimés, l'association d'HPMC à un principe actif permet de ralentir sa libération. Plusieurs paramètres différents interviennent pour modifier cette libération :

- la diffusion de l'eau dans le polymère,
 - la diffusion du principe actif au travers de la matrice de polymère,
 - le pourcentage de polymère dans le système matriciel,
 - le poids moléculaire et la viscosité de l'HPMC,
 - la granulation du principe actif et de l'excipient.
-
- La diffusion de l'eau dans le polymère.

C'est grâce à la diffusion rapide de l'eau dans le polymère que le gel d'HPMC se forme. Cette formation rapide du gel permet d'éviter une destruction précoce de la matrice, contrairement aux autres polymères (hydroxypropylcellulose et carboxyméthylcellulose) (Alderman, 1984).

- La diffusion, la dissolution et le transport du principe actif dans le polymère.

Dans un système sec, il n'y a pas de diffusion du principe actif. C'est avec la formation du gel d'HPMC, que la mobilité des molécules apparaît. Elle est comparable à celle d'une solution aqueuse. Les coefficients de diffusion sont du même ordre que dans l'eau pure. Le transport de masse dans le système se fait selon les trois dimensions de l'espace ; la 2^{ème} loi de Fick peut être appliquée si on considère le système comme une sphère (Siepmann *et al.*, 2002). Cependant, la diffusion du principe actif varie selon sa solubilité. Lors du mouillage initial de la surface du comprimé, le polymère s'hydrate partiellement formant une couche de gel permettant au principe actif soluble d'être libéré de la couche externe du comprimé.

Avec les principes actifs insolubles dans l'eau, la tendance de la matrice est à l'érosion surtout après l'hydratation complète de la matrice. En effet, les particules de principe actif non dissoutes sont transportées à travers le gel, ce qui réduit le gonflement et l'étendue des chaînes de polymères. Ce phénomène entraîne une modification de la résistance du gel à l'érosion en modifiant sa consistance. Les principes actifs insolubles sont donc libérés principalement par l'érosion du comprimé (Colombo *et al.*, 1996 ; Bettini *et al.*, 1998, 2001).

Avec les principes actifs solubles dans l'eau, deux mécanismes se superposent : la diffusion et l'érosion. Avec l'augmentation de la concentration d'eau, le coefficient de diffusion du principe actif augmente. La diffusion prédomine largement sur l'érosion, car si le gel a une bonne dureté le principe actif soluble peut diffuser avant que l'érosion n'agisse (Bettini *et al.*, 2001). C'est de cette manière que notre principe actif : la vancomycine va diffuser au travers de l'HPMC en raison de son hydrosolubilité.

- Le pourcentage de polymère dans le système matriciel.

En faisant varier le pourcentage d'HPMC et de lactose dans un comprimé, Gao (1996) démontre clairement que la vitesse de libération du principe actif est prolongée avec l'augmentation du pourcentage d'HPMC dans le système. En effet, 75 % du principe actif est libéré au bout de 6 heures, pour un rapport HPMC/lactose de 20/77 ; et la même quantité de principe actif est libérée en 14 heures, pour un rapport de 80/17.

- Le poids moléculaire et la viscosité de l'HPMC

Dans la même étude, Gao (1996) a étudié l'influence du poids moléculaire et de la viscosité de l'HPMC sur la vitesse de libération d'un principe actif contenu dans la matrice. Il en a déduit que la vitesse de libération du principe actif était diminuée avec l'augmentation de la viscosité de l'HPMC, jusqu'à une valeur limite. Pour les hautes viscosités (4000, 15000 et 100000 mPa.s) la diffusion du principe actif est identique dans le gel, ceci est dû à une composition et une épaisseur de gel similaires. Au contraire, pour les basses viscosités (100 mPa.s), la diffusion du principe actif est très rapide à cause du gonflement inhomogène de l'HPMC et de la destruction rapide de la matrice en raison de sa faible résistance.

L'augmentation du poids moléculaire augmente la viscosité du gel et donc ralentit la diffusion du principe actif. Ces deux paramètres sont intimement liés. Plus le poids moléculaire est élevé et plus la viscosité du gel est importante, plus le gel est résistant à la dissolution et à l'érosion, ce qui est essentiel pour contrôler la libération du principe actif (Bettini *et al.*, 2001 ; Alderman , 1984).

- Effet de la granulométrie

La vitesse de libération du principe actif peut être modifiée si les granulométries du principe actif et des excipients sont très hétérogènes. En effet, cette différence entraîne une modification de la vitesse de dissolution et de la formation du gel (Alderman, 1984).

3) Comment associer l'HPMC?

Il existe plusieurs manières d'associer l'HPMC au BCP :

- soit l'HPMC est ajoutée sous forme de gel obtenu par mouillage de la poudre,
- soit par simple mélange des poudres d'HPMC et de phosphate de calcium,
- soit par granulation humide du mélange de poudres.

Plusieurs paramètres sont d'ores et déjà connus concernant la granulation de l'HPMC. La composition du mélange de poudres à granuler influence la formation des granules et par la suite ses propriétés de désintégration. Selon la viscosité et la concentration d'HPMC, le granule va se former différemment. Plus la quantité d'HPMC dans le mélange à granuler est importante, et plus la quantité d'eau à ajouter est augmentée. Les granules formés sont gros et irréguliers, à cause du gonflement de l'HPMC. De plus, la poudre s'agglomère plus vite avec des viscosités élevées. Après le séchage, les granules cassent en petites particules irrégulières. La granulométrie devient très hétérogène (Xu *et al.*, 1997).

L'utilisation de plusieurs granulations successives permet de remédier aux irrégularités des granules. Les résultats sont meilleurs avec plusieurs granulations successives, elles permettent de régulariser la taille des granules et de minimiser les imperfections (Klinger *et al.*, 1990; Khan & Zhu, 1998).

La granulation montre un intérêt également pour la libération du PA. Si elle est effectuée avec un polymère hydrophile, elle permet de prolonger celle-ci en comparaison à une granulation effectuée sans ce polymère (Klinger *et al.*, 1990). De même, la taille des granules joue un rôle important : pour les gros granules, la rupture est plus difficile, donc prend plus de temps et plus d'énergie pour casser les liaisons, de ce fait la libération du PA se fait plus progressivement. (Vu *et al.*, 2003)

5- Conclusion

Parmi les différents substituts osseux présentés, c'est le BCP qui nous servira de support dans la suite de l'étude. L'objectif est d'obtenir une libération prolongée de l'antibiotique associé à ce biomatériau. L'application médicale serait de traiter ou d'éviter une infection au sein du site d'implantation, l'os. L'antibiotique choisi est la vancomycine, elle présente l'avantage d'avoir une bonne efficacité dans ce type d'infection, malgré les résistances à certains entérocoques et plus récemment à certains staphylocoques.

La modulation de cette libération passe par l'utilisation d'une méthode de mise en forme, qui a montré, d'après la littérature, des résultats très concluants sur les essais de libération : la compression isostatique.

L'HPMC est l'agent liant utilisé pour ralentir cette libération. Ce choix s'est effectué suite à l'utilisation importante de cet excipient dans l'industrie pharmaceutique pour obtenir des formes orales à libération prolongée.

II- PARTIE EXPERIMENTALE

D'après l'étude bibliographique, Gautier *et al.* ont montré que le procédé de mise en forme du BCP, par la compression isostatique, permettait d'obtenir les meilleurs temps de libération de la vancomycine associée. L'incorporation d'un principe actif peut se faire avant la mise en forme du substitut osseux ou dans une étape ultérieure, une fois le substitut formulé. Cette équipe de recherche a obtenu les meilleurs résultats en associant l'antibiotique (sous forme de poudre), par simple mélange, au BCP avant la compression isostatique. L'autre solution, moins concluante, consiste à incorporer la vancomycine (sous forme de solution aqueuse) par adsorption après l'étape de compression. De plus, il a été démontré que l'augmentation de pression appliquée lors du procédé de compression isostatique améliore le temps de libération (Gautier *et al.*, 2000b).

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser une force de compression isostatique de 150 MPa. La vancomycine est incorporée à 5 % (pourcentage massique) au mélange BCP/HPMC afin de prétendre à une efficacité *in situ*. L'incorporation d'HPMC au BCP est effectuée de deux façons :

- soit par simple mélange,
- soit en utilisant la granulation humide.

L'objectif de ce projet est de voir :

- si l'ajout d'HPMC influence la libération de vancomycine,
- et si l'opération de granulation a également une influence sur la libération.

La vancomycine est associée, juste avant l'étape de compression isostatique, par simple mélange à la poudre précédente granulée ou non. Différents pourcentages d'HPMC sont testés : 2, 6, 10 et 14 % (pourcentage massique). Au préalable, la caractérisation physicochimique et l'étude de rhéologie sont réalisées sur le phosphate de calcium biphasé obtenu par synthèse chimique. De plus, pour chaque échantillon formulé, des analyses de la dureté et de la porosité sont effectuées.

1- Préparation du BCP

a- Synthèse du CDA

Principe :

La synthèse d'apatite est réalisée par l'hydrolyse alcaline du calcium hydrogénophosphate dihydraté (DCPD, Merck, France) en présence de soude (Sigma-Aldrich, France) selon le protocole suivant :

- 2670 g de DCPD sont ajouté à 15 L d'eau distillée et 480 g de NaOH pour subir une hydrolyse alcaline pendant 4 heures sous chauffage à reflux.
- Après décantation et élimination du surnageant, le produit obtenu est rincé plusieurs fois avec de l'acide chlorhydrique (Prolabo, France) et de l'eau, puis de l'eau distillée pure jusqu'à obtenir un pH stable et inférieur à 10.
- La poudre est ensuite filtrée sur Büchner puis séchée à l'étuve à 80 °C pendant cinq jours jusqu'à un poids constant.

Résultat :

Le produit final obtenu est de l'apatite déficiente en calcium (CDA : *calcium deficient apatite*).

Le lot synthétisé est le lot n°13.

b- Pré-granulation humide

Principe :

- De l'eau distillée est ajoutée à l'apatite déficiente en calcium jusqu'à obtenir un mouillage suffisant de la poudre à l'aide d'un mélangeur planétaire (BRAUN, France).
- La poudre humectée est ensuite granulée avec le granulateur oscillant (ERWEKA AR400, Apparatebau GmbH Heusenstamm, Allemagne) sur une grille de maille 1,040 mm.
- Le mélange précédent est granulé une seconde fois sur une grille de diamètre 0,630 mm.
- Le CDA granulé est ensuite mis à l'étuve à 40° C pendant 24 heures.

Résultats :

Après 24 heures, on obtient une poudre de CDA granulée qui va subir à la prochaine étape : le frittage.

c- Frittage

Principe :

La poudre de CDA granulée est placée dans des creusets dans un four (Vecstar, Eurotherm, Suisse). La poudre est soumise au programme de température suivant :

- montée en température : 30°C/min jusqu'à 1050°C,
- pallier de 5 heures à 1050°C,
- refroidissement lent : 3°C/min jusqu'à 20°C.

Résultats :

Le frittage permet d'obtenir à partir du CDA, le phosphate de calcium biphasé (BCP : *biphasic calcium phosphate*) composé d'hydroxyapatite, (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et de phosphate tricalcique, (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en proportions variables.

d- Caractérisation physico-chimique

1) Diffraction des rayons X

Principe :

La diffraction des rayons X permet d'étudier la structure cristalline du composé. La mesure est faite à partir de la réflexion sélective en utilisant la loi de Bragg :

$$\lambda = 2 d \sin\theta$$

λ : Longueur d'onde des rayons X (en nm)

d : Distance interéticulaire (en nm)

θ : Angle d'incidence du faisceau (en degrés).

Les mesures de l'échantillon de BCP sont effectuées de 20° (2θ) à 40° (2θ) sur un diffractomètre PW1730 (Philips, France).

Résultats :

Le spectre obtenu est caractéristique du BCP.

Les pourcentages de β -TCP, de HAp et le rapport Ca/P sont calculés à partir de la méthode de Toth *et al.* (1991).

$$\% \text{ HA} = \frac{I_{100}(\text{HA})}{I_{100}(\text{HA}) + I_{100}(\beta\text{-TCP})}$$

$I_{100}(\text{HA})$: Hauteur maximale du pic caractéristique de l'HA.

$I_{100}(\beta\text{-TCP})$: Hauteur maximale du pic caractéristique du β -TCP.

D'après cette formule, les pourcentages de notre lot n°13 sont de :

- β -TCP = 62,13 %
- HA = 37,86 %

Le rapport calcium sur phosphore (Ca/P) est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Ca/P} = (\text{HA} \times 1,67) + (\beta\text{-TCP} \times 1,5)$$

avec $(\text{Ca/P})_{\text{HA}} = 1,67$ et $(\text{Ca/P})_{\beta\text{-TCP}} = 1,5$

Le rapport obtenu pour le lot n°13 est : $\text{Ca/P} = 1,56$

2) Spectrophotométrie infra-rouge

Principe :

La poudre de BCP (1 mg) est dispersée dans du KBr de grade spectroscopique (Sigma-Aldrich, France) (300 mg) dans un mortier d'agate. Le mélange homogène obtenu est comprimé sous une forte pression pour obtenir une pastille. Au préalable, une pastille de KBr seul est analysée pour éliminer le bruit de fond. Les mesures sont effectuées en transmission par un spectrophotomètre Magna 500 FTIR (Nicolet Inc., Montigny Le Bretonneux, France). Le spectre obtenu est le résultat de l'analyse de 32 spectres (figure 8).

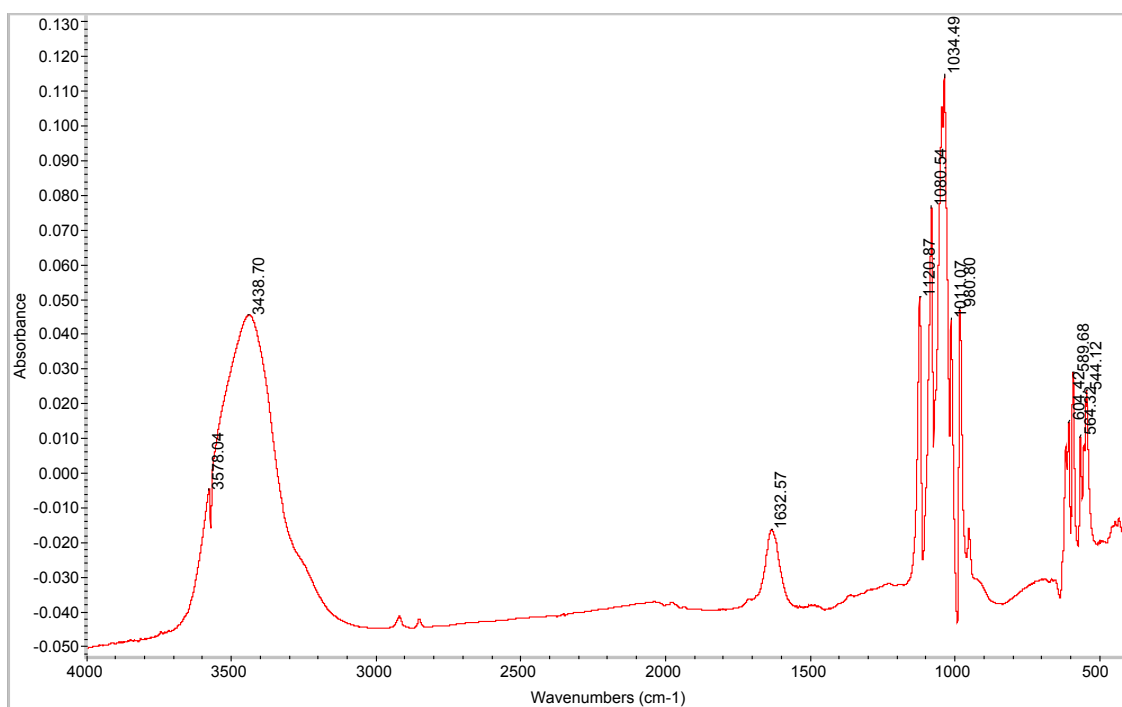


Figure 8: Spectre infra-rouge du BCP (lot n°13)

Résultats :

Sur le spectre, plusieurs pics sont caractéristiques :

- Les deux épaulements à 1120 et 1080 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration ν_3 PO_4^{3-} de la phase de phosphate tricalcique β .
- Le pic à 1034 cm^{-1} correspond aux modes de vibration ν_3 PO_4^{3-} de la phase d'hydroxyapatite.
- Le massif de pics entre 500 et 700 cm^{-1} est dû aux modes de vibrations ν_4 PO_4^{3-} des phases d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique composant le BCP.
- Aucun pyrophosphate n'est détecté (absence de pics à 930 et 723 cm^{-1}) et également aucun carbonate (il n'y a pas de pics à 870 cm^{-1} et entre 1400 et 1550 cm^{-1}).
- Les pics à 1632 et 3438 cm^{-1} correspondent à de l'eau, (elle devait être présente dans le KBr ou le BCP).

2- Formulation du substitut osseux

L'étape de formulation consiste à associer au BCP de l'HPMC en utilisant deux méthodes différentes:

- par simple mélange (à sec)
- ou par granulation humide.

Le mélange de poudres obtenues est caractérisé par une analyse rhéologique selon les tests décrits par la Pharmacopée Européenne.

Ensuite dans une autre étape, la vancomycine est ajoutée à 5 % (pourcentage massique) au mélange précédent. Le mélange final est comprimé à 150 MPa à l'aide d'une presse isostatique. Des études de la porosité et de la dureté sont effectuées sur les blocs obtenus.

a- Mélange de l'Hydroxypropylméthylcellulose au BCP

Principe :

Afin de voir l'éventuelle modification du temps de libération, l'HPMC est ajouté au BCP à des pourcentages différents, soit 2, 6, 10 et 14 %. L'incorporation se fait à l'aide d'un mélangeur (TURBULA type T2C, Wab Suisse) en réalisant un mélange progressif (trois fois cinq minutes). Ensuite, une granulation humide (avec de l'eau distillée) est réalisée sur les échantillons contenant 2, 6, 10 et 14 % d'HPMC. Au final sept échantillons sont testés :

- soit trois mélanges non granulés de BCP et d'HPMC à 2, 6, 10 %,
- soit quatre mélanges granulés de BCP et d'HPMC à 2, 6, 10 et 14 %.

b- Rhéologie

Définition :

La rhéologie consiste à étudier les propriétés d'écoulement d'une poudre.

Principe :

Les échantillons sont soumis à plusieurs tests décrits à la Pharmacopée Européenne :

- Le volume apparent : 100 g de poudre est versée dans une éprouvette. En cas d'impossibilité, il convient de choisir une prise d'essai dont le volume apparent est compris entre 50 et 250 mL, le volume et la masse de l'échantillon seront notés avec précision. La quantité de matière mise à notre disposition étant inférieure à 100 g, nous prenons une prise d'essai d'environ 50 g dont le volume apparent varie de 54 à 90 mL. L'éprouvette placée sur un volumétre de tassage est soumise à 1250 à-coups. Les résultats sont exprimés par :
 - le volume vrac, il correspond à 0 à-coups,
 - V_{10} , il correspond à 10 à-coups,
 - V_{500} , à 500 à-coups,
 - le volume tassé, à 1250 à-coups,
 - l'aptitude au tassement, elle correspond à la différence entre V_{10} et V_{500} ,
 - les masses volumiques apparentes avant et après tassement.

Si la différence entre V_{500} et V_{1250} est supérieure à 2 mL, 1250 à-coups supplémentaires sont réalisés.

- Le temps d'écoulement : Une prise d'essai, pesée avec précision est introduite sans tasser dans un entonnoir sec, dont l'orifice est préalablement obturé. La quantité d'échantillon dépend du volume apparent et de l'appareil utilisé. Dans notre cas, environ 50 g de poudre est versée dans un entonnoir calibré. Une fois l'orifice libéré, le temps d'écoulement de la totalité de l'échantillon est mesuré. Trois déterminations sont nécessaires. Le résultat exprime la moyenne de ces trois mesures.

- L'angle de repos : 50 g de poudre environ en s'écoulant à travers un entonnoir calibré forment un cône de poudre. La mesure de l'angle s'effectue en déterminant la hauteur (h) et le rayon (r) de ce cône.

Résultats :

La rhéologie de chaque mélange est étudiée, ainsi que celle du BCP. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

	Forme non granulée du mélange BCP/HPMC				Forme granulée du mélange BCP/HPMC				
	0% HPMC	2 % HPMC	6 % HPMC	10 % HPMC	0% HPMC	2 % HPMC	6 % HPMC	10 % HPMC	14% HPMC
Masse (en g)	50	49,8	50,3	46,1	50	52,5	43,8	50	50
Volume apparent (n=1)									
Volume vrac (en mL) = V0	66	70	70	60	54	90	71	76	88
V10 (en mL)	60	58	61	54	46	82	65	74	82
V500 (en mL)	50	48	48	48	38	74	58	70	76
Volume tassé (en mL) = V1250	48	46	46	48	38	74	58	70	74
Aptitude au tassement (en mL) = V10- V500	10	10	13	4	8	8	7	4	4
Masse volumique apparente avant tassement = m/V0 (en g/mL)	0,75	0,71	0,72	0,76	0,93	0,58	0,62	0,66	0,57
Masse volumique apparente après tassement = m/V1250 (en g/mL)	1,04	1,08	1,09	0,96	1,32	0,71	0,75	0,71	0,67
Ecoulement (en s) (n=3)	1,94 ± 0,09	3,45 ± 0,25	Infini	1,76 ± 0,14	1,51 ± 0,10	2,93 ± 0,35	3,34 ± 0,97	5,11 ± 0,27	4,98 ± 0,27
Angle de repos (n=1)									
tan α = h/r (en degrés)	---	---	---	---	---	38,6°	39,6°	37,3°	41°

Tableau 5 : Rhéologie du BCP et des différents échantillons.

(--- : non mesurable)

D'après le tableau 5, on observe que :

- L'aptitude au tassement varie de 4 à 13 mL. Elle est plus importante pour les formes non granulées que pour les formes granulées. (ex : l'aptitude au tassement est de 7 mL pour le mélange granulé à 6 % d'HPMC contre 13 mL pour le mélange non granulé à 6 % HPMC).
- Les masses volumiques apparentes avant tassement varient de 0,57 à 0,93 g/mL et de 0,67 à 1,32 g/mL après tassement. Ces masses volumiques sont plus faibles pour les formes granulées que pour les formes non granulées [ex : $m/V_{1250} = 0,83 \pm 0,24$ g/mL (formes granulées) contre $1,04 \pm 0,05$ g/mL (formes non granulées)].
- Les temps d'écoulement des différents échantillons semblent très aléatoires et non corrélés à la granulation et au pourcentage d'agent liant ajouté, ils varient de 1,76 secondes à l'infini.
- L'angle de repos ne peut pas être mesuré pour les mélanges simples et le BCP car la poudre ne s'écoule pas à travers l'entonnoir. Il varie de 37° à 41° pour les poudres granulées.
- Le BCP a le même comportement rhéologique que les formes non granulées [ex : l'aptitude au tassement est de 10 mL pour le BCP et 10 mL pour le mélange simple à 2 % d'HPMC ; $m/V_0 = 0,75$ g/mL (BCP) pour $0,73 \pm 0,02$ g/mL (formes non granulées) ; et $m/V_{1250} = 1,04 \pm 0,05$ g/mL (BCP) pour 1,04 g/mL (formes non granulées)].

c- Mélange avec la vancomycine.

- *Conditions particulières de conservation :*

La vancomycine se dégrade à la lumière en se colorant en rose. D'après la littérature, la solution à base de chlorhydrate de vancomycine est stable 24 heures à température ambiante (+ 25°C) et quinze jours entre + 2°C et + 8°C (Vidal, Edition 2002).

Principe:

La vancomycine est ajoutée à raison d'un pourcentage de 5 % (masse/masse) dans le mélange BCP/HPMC. Ce pourcentage permet d'atteindre la concentration minimale inhibitrice ($CMI \leq 4 \text{ mg.L}^{-1}$) lors du relargage de la vancomycine à travers le substitut osseux.

Trois spécialités de vancomycine ont été utilisées pour réaliser les différentes expériences :

- La VANCOCINE ® voie orale, Lilly, lot n° 224794, exp. 12/2003.

Composition : - Chlorhydrate de vancomycine

- Calcium edétate de sodium

- Acide chlorhydrique

- La VANCOCINE ® 500 mg, voie injectable, Lilly, lot n° 4MF81MA, exp. 04/02

Composition : - Chlorhydrate de vancomycine

- La VANCOMYCINE Merck ® 1 g, voie injectable, lot n°ED042, exp. 08/03

Composition : - Chlorhydrate de vancomycine

En raison du retrait du marché de la forme orale, la vancomycine injectable a été utilisée en remplacement, après vérification des gammes d'étalonnages.

La gamme d'étalonnage, réalisée par spectrophotométrie UV, de la vancomycine voie orale est superposable aux deux gammes d'étalonnage de la vancomycine voie injectable (figure 9). La comparaison des essais réalisés avec la voie injectable ou la voie orale est donc possible. Dans la suite de l'exposé, il n'y a pas de distinction de faite entre la voie orale et la voie injectable.

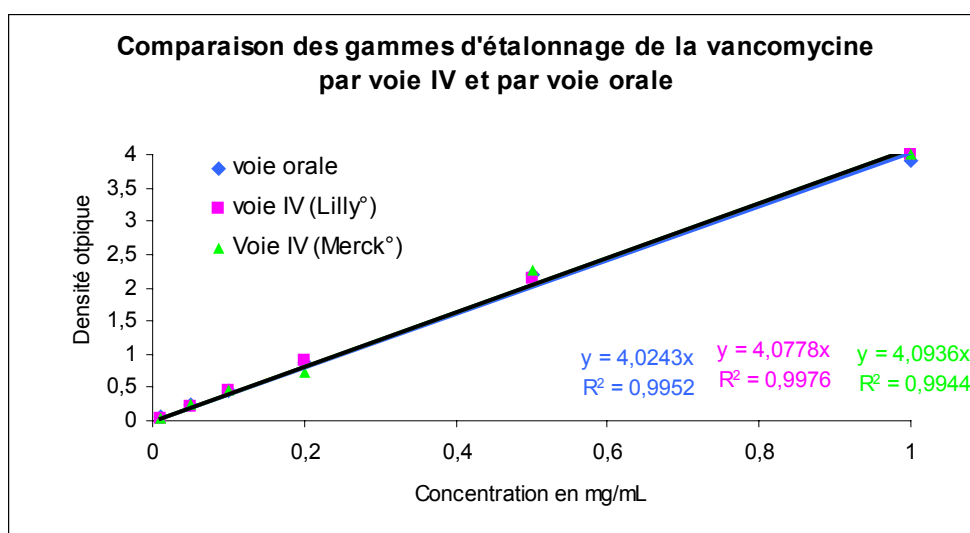


Figure 9: Gammes d'étalonnage de la vancomycine

L'incorporation de la vancomycine se fait à l'aide d'un mélangeur (TURBULA type T2C, Wab, France) par un mélange progressif (trois fois cinq minutes).

Remarques :

- Avant le mélange, la vancomycine est broyée dans un mortier à l'aide d'un pilon pour briser les agglomérats de poudre et faciliter le mélange.
- Une fois les mélanges effectués, les échantillons sont conservés à l'abri de la lumière.
- La vancomycine est ajoutée juste avant la compression isostatique au mélange HPMC/BCP pour éviter tout risque de démixage dû aux légères différences de granulométrie des poudres.

d- Compression isostatique

Principe:

L'appareil utilisé est une presse isostatique 150 MPa n° FF558 (Nova Swiss, France). Les échantillons sont mis sous vide dans des moules élastiques étanches, puis ils sont soumis à une pression de 150 MPa pendant deux minutes. Le programme de montée et de descente en température est imposé par la presse. Le produit final obtenu est un bloc cylindrique que l'on peut découper avec une petite scie circulaire (Maxicraft 750002, Hobbyflex).

e- Caractérisation des compacts

1) Porosité

Principe :

La porosimétrie à mercure est basée sur la pénétration capillaire d'un liquide non mouillant (le mercure) dans les pores cylindriques d'un matériau. La loi qui s'applique est la relation de Washburn :

$$D = - (1 / P) 4 \gamma \cos\theta$$

D : le diamètre des pores (en m)

P : la pression appliquée (en N)

γ : la tension de surface (en N.m⁻¹)

θ : l'angle de contact (en degrés)

Le corps poreux à étudier est mis en présence de mercure, celui-ci ne pénètre pas dans les pores du fait de son angle de contact supérieur à 90°. Il faut utiliser une pression d'autant plus grande que les pores sont petits pour faire pénétrer le mercure. La mesure du volume ayant pénétré dans les pores est réalisée grâce à une mesure de capacité. La tige creuse du pénétromètre en verre est métallisée pour devenir conductrice, elle joue avec le mercure le rôle des électrodes.

Les mesures sont faites à l'aide d'un porosimètre à mercure (Micromeritics Autopore III 9400, Creil, France).

Un échantillon d'environ 2 g est placé dans le pénétrromètre (figure 10).

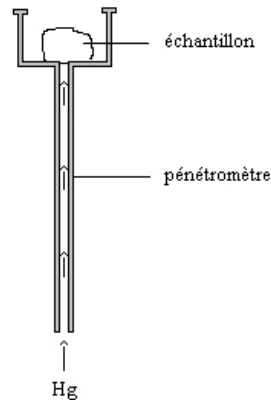


Figure 10: Montée du mercure pendant la phase d'intrusion

Celui-ci est soumis successivement à deux programmes de pression :

- Les basses pressions (du vide à la pression atmosphérique) avec un temps d'équilibration pour chaque pression de 10 secondes.
- Les hautes pressions (de la pression atmosphérique à 420 MPa) avec un temps d'équilibration pour chaque pression de 20 secondes.

La première étape correspond à la phase d'intrusion, le mercure pénètre progressivement dans l'échantillon avec la montée en pression (en Psia ; $1 \text{ Psia} = 6,8927 \cdot 10^3 \text{ Pa}$). A 30000 Psia commence la phase d'extrusion, le mercure est éliminé de l'échantillon. Cette technique permet de mesurer la porosité globale d'un matériau, c'est à dire le rapport du volume des espaces vides sur le volume global du matériau et de définir les différentes classes de micropores (diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$), de mésopores (diamètre compris entre 10 et $100 \mu\text{m}$) et de macropores (diamètre supérieur à $100 \mu\text{m}$).

Résultats :

Les mesures de porosité sont faites sur l'ensemble des échantillons :

- les formes non granulées de BCP/HPMC à 2, 6 et 10 % d'HPMC,
- les formes granulées de BCP/HPMC à 2, 6, 10 et 14 % d'HPMC,
- les témoins : le BCP granulé et le BCP non granulé.

Pour chacun des échantillons, trois petits blocs sont analysés.

Les pourcentages moyens de macropores, mésopores, micropores et le pourcentage de porosité totale des différents échantillons sont répertoriés dans le tableau 6. Les courbes exprimant le volume de mercure pénétré dans l'échantillon en fonction du diamètre des pores sont présentées dans l'annexe I (figure 22 à 31).

Le tableau 6 doit être lu de cette manière : l'échantillon à 2 % d'HPMC non granulé présente une porosité totale de 34,57 %. Cette porosité est composée de 98,15 % de micropores, 0,82 % de mésopores et 1,03 % de macropores.

	Forme non granulée du mélange BCP/HPMC				Forme granulée du mélange BCP/HPMC				
	0 % HPMC (n=3)	2 % HPMC (n=3)	6 % HPMC (n=3)	10 % HPMC (n=3)	0 % HPMC (n=3)	2 % HPMC (n=3)	6 % HPMC (n=3)	10 % HPMC (n=3)	14% HPMC (n=3)
Pourcentage de porosité totale	36,47 ± 2,64	34,57 ± 0,28	34,60 ± 0,32	36,71 ± 0,66	41,56 ± 7,00	39,29 ± 10,10	31,77 ± 1,02	31,4 ± 1,01	40,98 ± 12,15
Pourcentage de micropores: 0 µm < d < 10µm	97,1 ± 1,77	98,15 ± 0,35	95,68 ± 1,62	95,55 ± 1,31	98,13 ± 0,48	98,48 ± 0,20	97,61 ± 0,30	94,16 ± 1,10	95,17 ± 3,32
Pourcentage de mésopores: 10 µm < d < 100 µm	0,97 ± 0,71	0,82 ± 0,09	1,86 ± 0,55	1,50 ± 0,17	0,84 ± 0,32	0,72 ± 0,13	1,18 ± 0,45	2,11 ± 0,01	1,47 ± 1,25
Pourcentage de macropores: d > 100µm	1,93 ± 1,06	1,03 ± 0,27	2,46 ± 1,07	2,95 ± 1,18	1,03 ± 0,17	0,80 ± 0,10	1,22 ± 0,14	3,73 ± 1,10	3,36 ± 2,08

Tableau 6: Répartition des classes des pores pour chaque échantillon

D'après ces résultats, pour tous les échantillons, le pourcentage de micropores est largement prédominant (94,2 à 98,5 %). Le pourcentage de macropores pour chaque échantillon bien que faible (0,8 à 3,7 %) est toujours supérieur à celui des mésopores (0,7 à 2,1 %). Il semble que l'ajout d'HPMC permette de diminuer légèrement ce pourcentage de microporosité au profit des macropores et des mésopores. En ce qui concerne le pourcentage de porosité totale, il varie de 31,4 à 41,6 %. Pour les échantillons à 2 et 14 % d'HPMC de la forme granulée, l'écart type est très élevé.

La répartition des classes de pores pour chaque échantillon est présentée sous forme d'histogramme sur la figure 11.

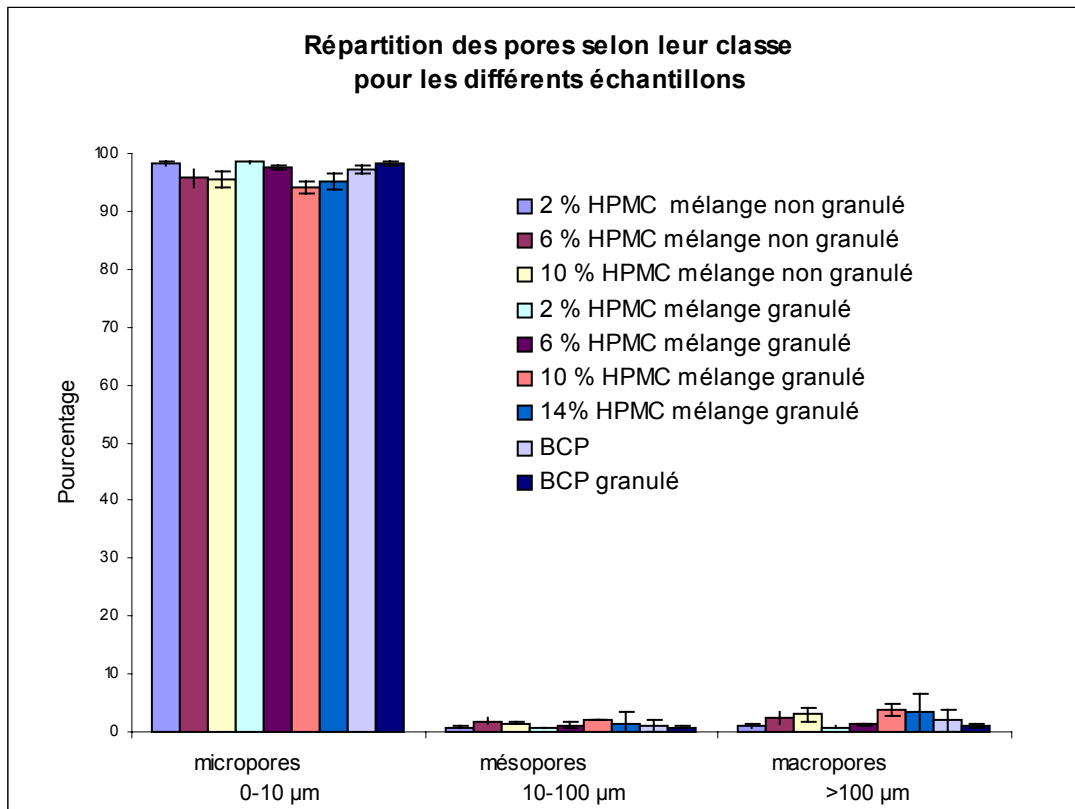


Figure11 : Répartition des classes de pores pour chaque échantillon

2) Dureté Vickers

Cette manipulation est effectuée à l'IUT de Sciences et Génie des Matériaux de Carquefou.

Principe :

L'essai consiste à imprimer un pénétrateur en forme de pyramide droite à base carrée sous une charge de 25 g à la surface de notre échantillon. Cette tige, en se retirant, laisse une empreinte : une pyramide à base carrée de diagonale (d) ayant au sommet le même angle que le pénétrateur. La diagonale (d) est mesurée par le logiciel à partir des deux diagonales (d_1) et (d_2) repérées sur l'empreinte visible au microscope. La dureté (H) s'exprime par le rapport de la force sur la surface de l'empreinte. Les chiffres de dureté sont sans dimension.

$$H = F / S$$

S : Surface de l'empreinte considérée (en m^2) (pyramide droite dans le cas de la dureté Vickers)

F : charge d'essai (en Newtons)

La dureté Vickers (HV) est déterminée d'après la formule suivante :

$$H V = \frac{0,189 F}{d^2}$$

Angle au sommet du pénétrateur : 136°

d : diagonale de l'empreinte (en mm) avec $d = (d_1 + d_2) / 2$

(d_1 et d_2 correspondent aux diagonales mesurées à partir de l'observation microscopique)

Mode opératoire :

Les blocs de forme cylindrique obtenus après compression isostatique sont découpés en compacts d'environ 0,5 cm d'épaisseur. Leurs surfaces sont polies avec un papier de verre et mises à niveau pour permettre la mesure. Une des surfaces est foncée avec un marqueur pour pouvoir être visualisée à l'écran du microscope. Une fois la mise au point réglée, le pénétrateur exerce une pression pendant quelques secondes. L'image de l'empreinte peut ensuite être visualisée à l'écran. Le logiciel exprime la dureté à partir des diagonales tracées.

La dureté est mesurée à l'aide du Microhardness Testers (Micronet 2100 séries, Buehler, USA). Une série de six mesures par échantillon est réalisée : deux mesures au centre et quatre en périphérie. Une précédente étude (non publiée) a montré l'absence de différence significative entre les mesures effectuées au centre et en périphérie.

Résultats :

Les résultats obtenus pour les différents échantillons sont répertoriés dans le tableau 7 :

	Dureté (HV)
Forme non granulée du mélange BCP/HPMC	
2 % HPMC	---
6 % HPMC	---
10 % HPMC	---
Forme granulée du mélange BCP/HPMC	
2 % HPMC (n=6)	4,47 ± 1,21
6 % HPMC (n=6)	7,62 ± 1,85
10 % HPMC (n=6)	8,55 ± 2,27
14 % HPMC (n=6)	12,55 ± 1,81
BCP	
non granulé (n=6)	4,94 ± 0,61
granulé (n=6)	4,67 ± 0,71

Tableau 7 : Résultats de la dureté

(--- : non mesurable)

La dureté des échantillons à 2, 6 et 10 % d'HPMC non granulé n'a pu être mesurée car la mise au point de l'image au microscope était très difficile et l'empreinte n'a pu être visualisée.

Le test statistique t de student a permis de mettre en évidence l'existence ou non d'une différence significative entre deux échantillons. D'après cette analyse statistique, les résultats montrent que :

- L'échantillon à 2% d'HPMC ne présente aucune différence significative de dureté avec l'échantillon de BCP et de BCP granulé.
- L'échantillon à 6% d'HPMC n'a pas de différence significative de dureté avec celui à 10% d'HPMC.
- Et le BCP qu'il soit granulé ou non ne présente aucune différence significative de sa dureté.
- Tous les autres échantillons ont des duretés significativement différentes entre eux.

D'après le tableau 7, la dureté des échantillons est augmentée avec l'augmentation du pourcentage d'agent liant dans la formule. La dureté de l'échantillon à 14 % est de 12,55 contre seulement 7,62 pour l'échantillon à 6% d'HPMC.

3- Cinétique de libération

a- Conditions opératoires

Trois petits blocs de masse comprise entre 0,15 et 0,35 g sont découpés dans les blocs obtenus par compression isostatique pour chacun des échantillons :

- mélanges non granulés de BCP/vancomycine/HPMC à 2, 6 et 10 %,
- mélanges granulés de BCP/vancomycine/HPMC à 2, 6, 10 et 14 %.

En parallèle, la libération de vancomycine de deux témoins est également étudiée :

- un avec du BCP non granulé et la vancomycine à 5 % (pourcentage massique),
- l'autre avec du BCP granulé et la vancomycine à 5 %.

Les trois échantillons de chaque série sont placés dans une chambre de culture Millicel® (Millipore, St Quentin Fallavier, France) de 12 mm de diamètre avec une membrane biopore® dont le diamètre des pores est de 0,4 μm . Chaque chambre de culture est collée avec un joint au couvercle d'une boîte de culture à six puits Costar® (Corning, New York, USA) (figure 12).

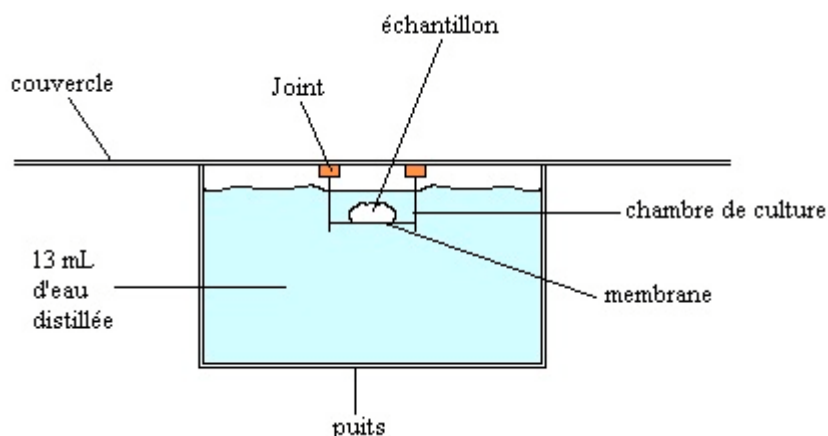


Figure 12: Mise en place de l'essai de libération

Chaque puit contient 13 mL d'eau distillée. Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C sur un plateau oscillant à 5 rév/min (3D rocking platform STR9, UK).

Plusieurs prélèvements sont réalisés à des temps réguliers $t = 1, 2, 3, 4, \dots, 24, 48$ heures ... jusqu'à obtenir la libération totale de la vancomycine. Pour effectuer le prélèvement, il suffit de remplacer la boîte de culture par une nouvelle remplie avec 13 mL d'eau distillée dans chacun des six puits. Chaque prélèvement est dosé au spectrophotomètre UV (Shimadzu UV 1605, France) à la longueur d'onde de 280 nm (longueur d'onde maximale d'absorption de la vancomycine). Les cuves de mesures utilisées sont des cuves en quartz, car le verre et le plastique absorbent à cette longueur d'onde. Le dosage spectrophotométrique est préféré à un essai microbiologique, car il est plus facile, plus rapide à mettre en place et moins coûteux. De plus, une précédente étude a montré l'absence de différence significative entre ces deux dosages (Gautier *et al.*, 2000a)

Connaissant la masse des blocs, le pourcentage de vancomycine, la quantité d'eau distillée dans chaque puit (13 mL), le pourcentage de vancomycine libéré au cours du temps peut être déduit. Ces résultats sont exprimés sous forme de courbes représentant le pourcentage moyen de vancomycine libérée en fonction du temps.

b- Cinétiques de libération du BCP non granulé et du BCP granulé

La figure 13 représente les courbes des cinétiques du BCP non granulé et du BCP granulé. Ces deux courbes correspondent aux témoins. Les valeurs numériques de ces cinétiques sont répertoriées dans le tableau n° 11 de l'annexe II.

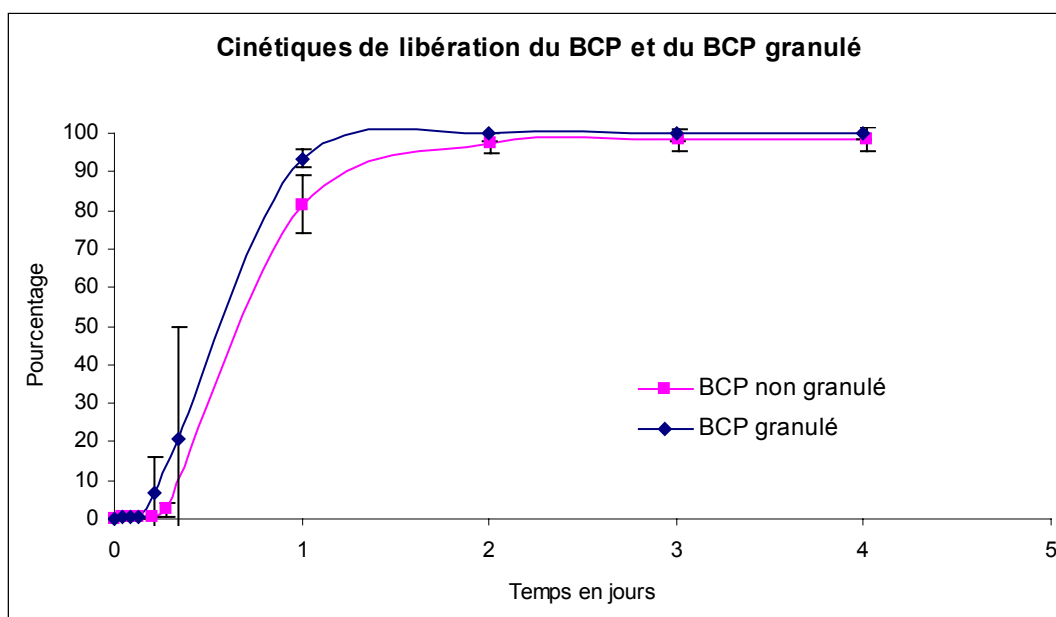


Figure 13 : Cinétiques de libération de vancomycine pour le BCP et le BCP granulé

Résultats :

Le tableau 8 indique les temps de libération de 50 % de vancomycine et le temps nécessaire pour atteindre le plateau de libération.

	BCP	BCP granulé
Durée correspondant à 50% de vancomycine libérée (en jours)	0,7	0,4
Durée correspondant à la fin de la libération de vancomycine (en jours)	2 (97,3%)	2 (100%)

Tableau 8 : Temps de libération de la vancomycine pour le BCP granulé ou non.

Les résultats montrent que le substitut osseux libère la totalité de la vancomycine en 2 jours.

c- Cinétiques de libération pour les mélanges non granulés

La figure 14 représente les courbes de la cinétique de libération obtenues avec les mélanges simples d'HPMC et de BCP aux pourcentages d'HPMC de 2, 6 et 10 %. Les valeurs numériques de ces courbes sont répertoriées dans le tableau 12 de l'annexe II. La courbe témoin (0% d'HPMC) est placée sur le graphique pour mémoire.

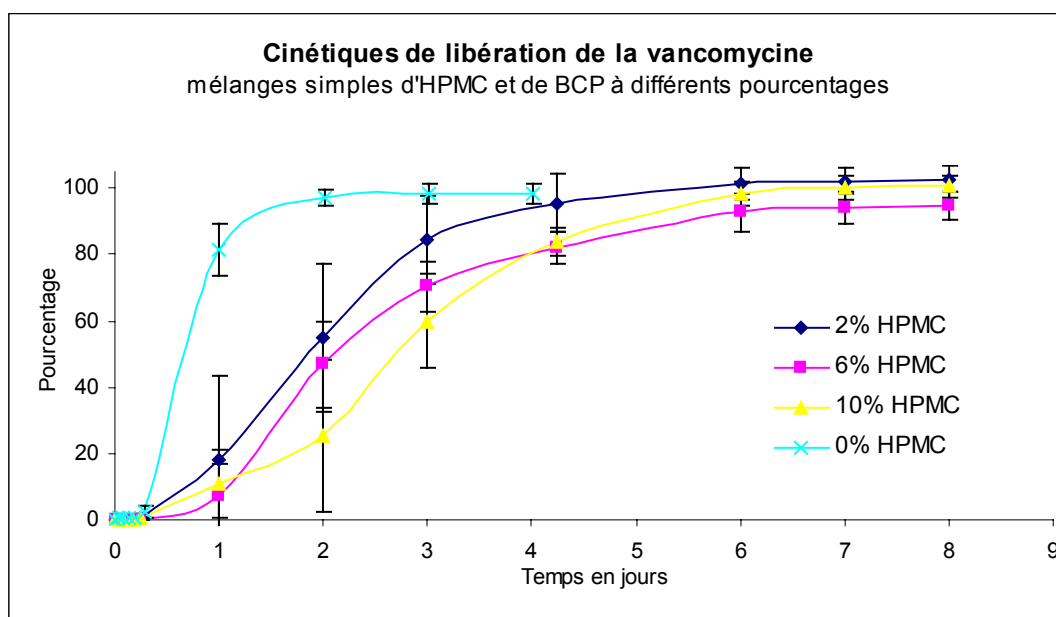


Figure 14 : Cinétiques de libération de la vancomycine

Résultats :

Les courbes de cinétiques peuvent être séparées en deux phases : une première phase avec une libération assez rapide d'environ 80 % de vancomycine et une deuxième phase de plateau jusqu'à atteindre les 100 % de vancomycine libérée. Seule la courbe sans HPMC a un profil un peu différent, la libération est massive dès le premier jour, contrairement aux autres courbes, où la première phase s'étale sur plusieurs jours. La phase de plateau est donc atteinte beaucoup plus rapidement.

Le tableau 9 indique pour chacun des échantillons les temps de libération de 50% de vancomycine et le temps nécessaire pour atteindre le plateau de libération.

	Pourcentage d'HPMC dans les mélanges non granulés			
	0%	2%	6%	10%
Durée correspondant à 50% de vancomycine libérée (en jours)	0,7	1,8	2,1	2,7
Durée correspondant à la fin de la libération de la vancomycine (en jours)	2 (97,3%)	5,8 (100%)	7 (94%)	7 (100%)

Tableau 9 : Temps de libération de la vancomycine pour les mélanges non granulés

Ces résultats montrent que le substitut osseux formulé sans granulation avec 2, 6 et 10 % d'HPMC libère la totalité de la vancomycine en 6 à 7 jours.

d- Cinétiques de libération pour les mélanges granulés

La figure 15 représente les courbes de la cinétique de libération obtenues avec les mélanges granulés d'HPMC et de BCP aux pourcentages d'HPMC de 2, 6, 10 et 14 %. La courbe à 0% correspondant au BCP sans HPMC sert de témoin. Les valeurs numériques de ces courbes sont répertoriées dans le tableau 13 de l'annexe II.

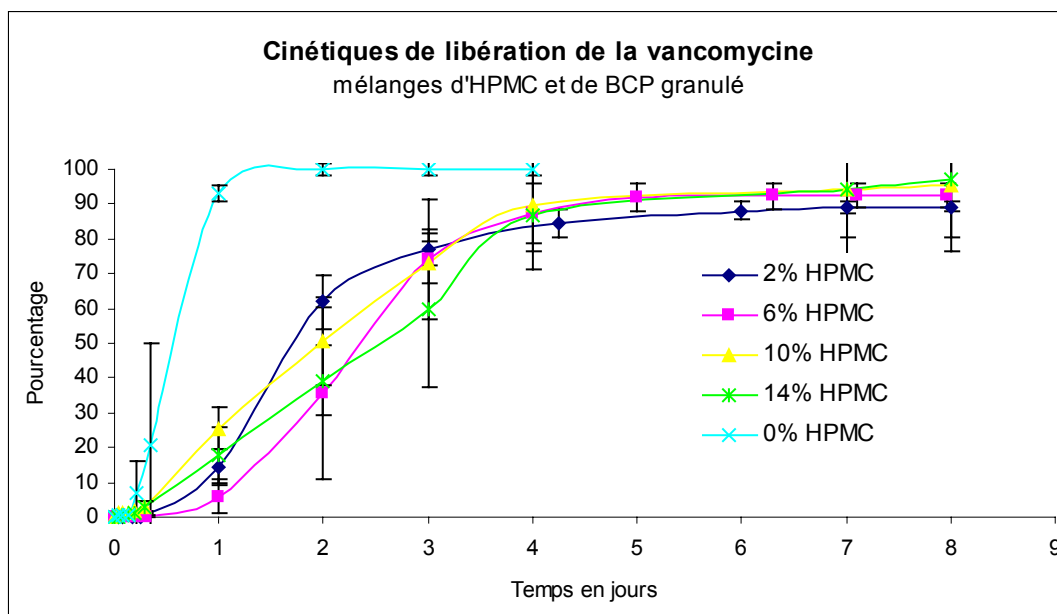


Figure 15 : Cinétiques de libération de la vancomycine

Résultats :

Les cinétiques de libération des échantillons granulés ont le même profil de courbe que celles des formes non granulées. De la même manière, elles présentent deux phases : une phase de libération rapide et une phase de libération plus lente (plateau). La courbe représentant l'échantillon granulé sans HPMC a également une libération beaucoup plus rapide lors de la première phase, et le plateau est atteint beaucoup plus rapidement que pour les autres échantillons granulés

Le tableau 10 indique pour chacun des échantillons les temps de libération de 50 % de vancomycine et le temps nécessaire pour atteindre le plateau de libération.

	Pourcentage d'HPMC dans les mélanges granulés				
	0%	2%	6%	10%	14%
Durée correspondant à 50% de vancomycine libérée (en jours)	0,4	1,7	2,4	2	2,5
Durée correspondant à la fin de la libération de vancomycine (en jours)	2 (100%)	6,5 (89%)	6,3 (92%)	8 (95%)	8 (97,2%)

Tableau 10 : Temps de libération de la vancomycine pour les mélanges granulés

Ces résultats montrent que le substitut osseux formulé par granulation avec 2, 6, 10 et 14 % d'HPMC libère la quasi totalité de la vancomycine en 6,3 à 8 jours.

e- Comparaison des cinétiques

Les figures 16 à 18 regroupent les échantillons ayant subi une granulation humide et ceux sans granulation. Elles permettent de comparer les deux méthodes au niveau des temps de libération pour chacun des pourcentages (2, 6 et 10 %).

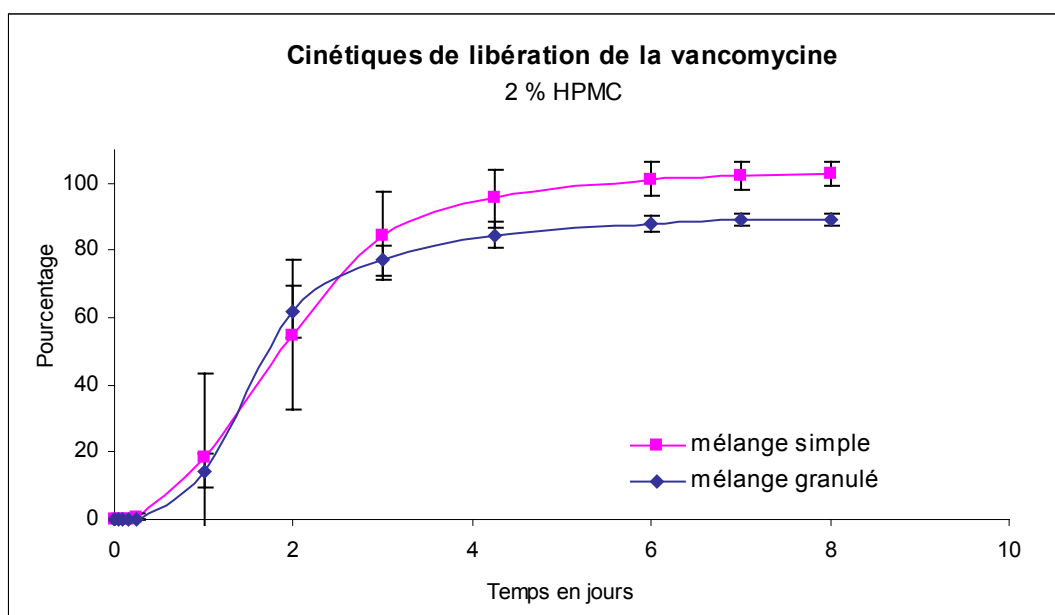


Figure 16 : Comparaison des cinétiques de libération pour 2 % d'HPMC

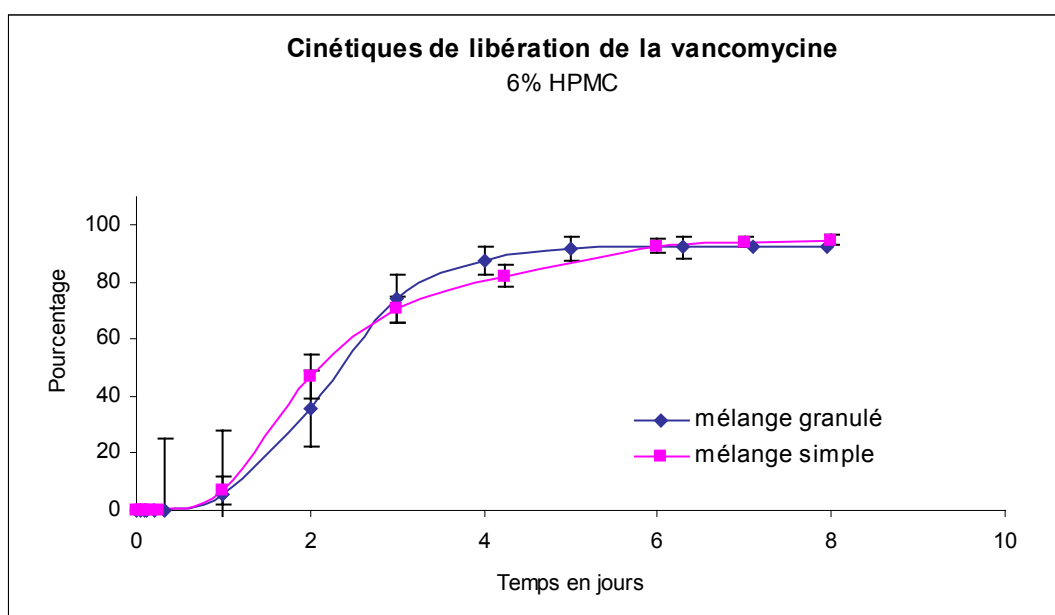


Figure 17 : Comparaison des cinétiques de libération pour 6 % d'HPMC

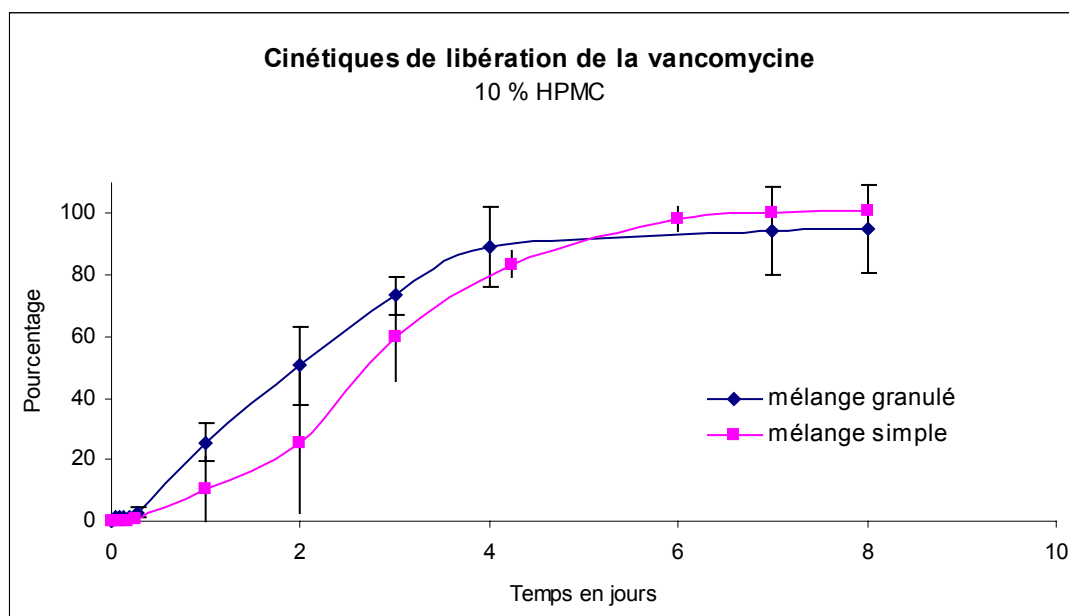


Figure 18 : Comparaison des cinétiques de libération pour 10 % d'HPMC

Résultats :

Les figures 16 à 18 montrent peu de différences au niveau des cinétiques de libération entre les mélanges granulés et non granulés, elles sont en partie superposables.

Le mélange granulé à 6 % d'HPMC de la forme non granulée, ainsi que les mélanges à 2, 6 et 10 % d'HPMC de la forme granulée n'ont pas libéré 100 % de la vancomycine à la fin des 8 jours [94 % de vancomycine libérée pour le mélange à 6% d'HPMC de la forme non granulée ; et pour les formes granulées la libération est de 89 % (pour 2 % d'HPMC), 92 % (pour 6 % d'HPMC) et 95 % (pour 10 % d'HPMC).]

III- DISCUSSION

1- Caractérisation physico-chimique

Les spectres obtenus par diffraction des rayons X et spectrophotométrie IR sont caractéristiques du BCP (Toth *et al.*, 1991). Le rapport Ca/P obtenu à partir du spectre de diffraction des rayons X est de 1,56. Il est légèrement inférieur au rapport moyen de l'os humain qui est de 1,61.

Les propriétés chimiques du BCP varient selon les proportions d'HAp et du β -TCP dans le mélange ; c'est ce qui permet de contrôler la vitesse de résorption et de substitution osseuse de la céramique. Plus le rapport HAp/ β -TCP est élevé, moins la solubilité du biphasé est importante. La résorption des implants ne doit pas être trop rapide. En effet, un certain temps est nécessaire pour que les cellules mésenchymateuses, plus ou moins différenciées, colonisent les macropores et permettent ainsi l'apposition osseuse. Le résultat clinique dépend donc de la cinétique de colonisation et de résorption (conditionnées par les caractéristiques physico-chimiques de l'implant).

2- Rhéologie

L'étude du comportement rhéologique des différentes poudres montre que le BCP a le même comportement rhéologique que les formes non granulées. D'autre part, il existe une différence de comportement entre les formes granulées et non granulées. L'opération de granulation améliore considérablement les propriétés d'écoulement et de tassement. Cependant, les différents pourcentages d'HPMC ne semblent pas influencer de façon majeure le comportement des poudres.

3- Dureté

Un des inconvénients des céramiques de phosphate de calcium est leur faible résistance mécanique (fragilité). En effet, la dureté doit être suffisante pour permettre une implantation osseuse et limiter le risque de rupture du biomatériau après son implantation. L'addition d'un agent liant devrait idéalement s'accompagner d'une augmentation de la résistance des blocs.

L'opération de granulation semble augmenter la dureté du fait que les échantillons obtenus sans granulation n'ont pu être testés en raison de leur trop grande friabilité. Cependant, il n'a pas été observé de différence significative entre le BCP non granulé et le BCP granulé. Mais ceci peut s'expliquer par le fait que le BCP se granule très mal quand il n'est pas associé à de l'HPMC. Les deux types de BCP présentent donc une dureté similaire.

D'après les résultats, la dureté est également augmentée par un pourcentage croissant d'HPMC, la dureté la plus élevée étant obtenue avec le mélange à 14 % d'HPMC. Cette augmentation de la dureté n'apparaît qu'à partir de 6 % d'HPMC. Pour les pourcentages inférieurs, aucune modification de la dureté n'est observée. Ces résultats se retrouvent dans des exemples plus conventionnels de comprimés à usage pharmaceutique. Par exemple, dans le cas des comprimés matriciels, la dureté du comprimé est augmentée avec l'augmentation de la proportion d'HPMC dans la formulation, pour une force de compression donnée. De même, la friabilité du comprimé est diminuée quand le pourcentage d'HPMC dans la formule augmente (Edube *et al.*, 1997).

La figure 19 permet de visualiser l'influence du pourcentage d'HPMC sur la dureté Vickers de nos échantillons.

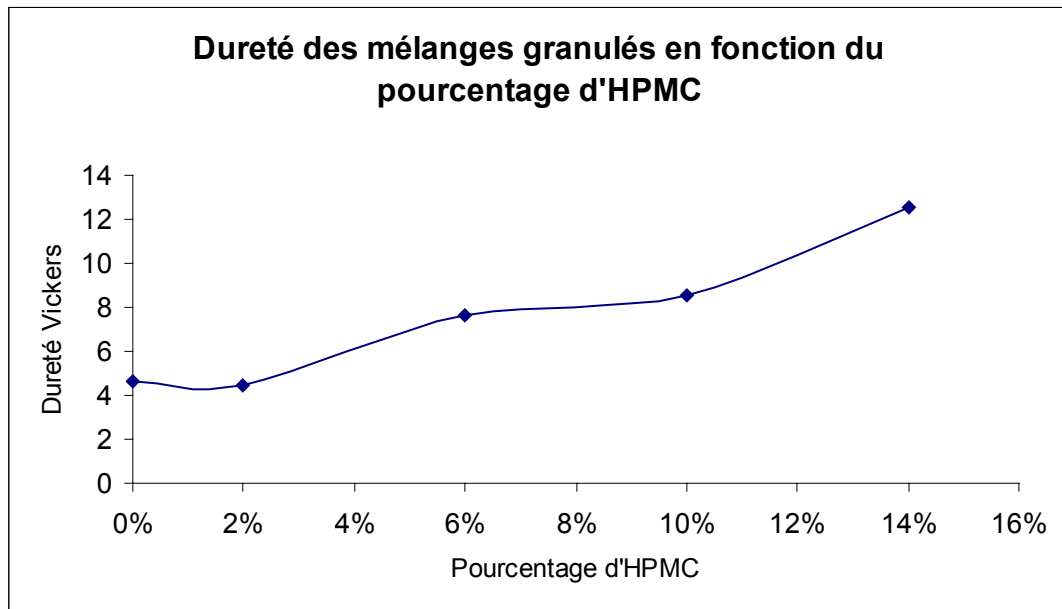


Figure 19 : La dureté en fonction du pourcentage d'HPMC

Le graphique montre une augmentation de la dureté entre 0 et 14 % d'HPMC. Plus l'HPMC est ajouté en proportion croissante et plus la dureté est augmentée. Cette augmentation de la dureté permet de renforcer les propriétés biomécaniques de notre biomatériau, qui peuvent être notamment amoindries par la porosité (Lu *et al.*, 1999). Le pourcentage d'HPMC influence très favorablement les caractéristiques biomécaniques de nos échantillons.

4- Porosité

La dégradation du biomatériau et la croissance osseuse dépendent en partie de la microstructure du biomatériau, c'est-à-dire de son volume, de sa densité, de la taille de ces pores, des interconnexions entre les pores et de sa surface spécifique. L'augmentation de porosité favorise la croissance osseuse, au détriment des propriétés biomécaniques du biomatériau (Lu *et al.*, 1999). La repousse osseuse au travers des macropores nécessite une taille minimale de 100 μm d'après Chang *et al.* (2000), Daculsi et Passuti (1990), et de 150 μm d'après Lu *et al.* (1999). Chaque étude définit sa taille optimale. Gauthier *et al.* (1998) ont montré qu'à partir d'un essai *in vivo* réalisé sur des fémurs de lapins, le BCP implanté conduit à une meilleure croissance osseuse pour une taille de pores de 565 μm par rapport à ceux d'une taille de 300 μm . D'après Lu *et al.* (1999), la taille de 10 μm permet aux cellules de circuler et de se former à l'intérieur du biomatériau, tandis qu'une taille de 15-50 μm permet au tissu fibreux de proliférer, et enfin une taille supérieure à 150 μm favorise la formation de l'os.

L'élément le plus important à considérer reste les interconnexions, car sans elles, la porosité ne présente aucun intérêt. Elles permettent et favorisent ainsi la croissance osseuse. En fait, les nombreuses divergences qui existent sur la taille des pores s'avèrent peu importantes, car la biorésorbabilité du matériau modifie la taille des pores. Ce sont les interconnexions qui restent le seul facteur limitant (Lu *et al.*, 1999). Les mesures de porosité se font par la pénétration du mercure au travers des pores, cette mesure n'est possible qu'en présence d'interconnexions. Cette méthode d'analyse prend donc bien en considération la porosité accessible par les fluides biologiques.

Après l'implantation, le matériau est le siège d'une dissolution extracellulaire et d'une dégradation d'origine cellulaire, qui dépend de la structure chimique (proportion en HAp et β -TCP) et physique (pores et environnement du matériau). Les fluides biologiques, occupant les micropores, s'enrichissent en calcium, ce qui aboutit à la précipitation des cristaux d'apatite similaires à ceux de l'os avoisinant, d'où l'importance des micropores. L'os néoformé se dépose en surface des pores périphériques sur tout l'implant. Les pores sont substitués par de l'os lamellaire avec le système haversien, (Daculsi & Passuti, 1990 ; Gauthier *et al.*, 1998). Les macropores et les mésopores permettent aux cellules de pénétrer dans l'implant.

Les échantillons préparés avec de l'HPMC ont une porosité totale variant de 31 à 41%. La répartition en macropores, mésopores et micropores des échantillons semble être la même quelque soit le mode de préparation (avec ou sans granulation). Il y a une majorité de micropores (>94 %) et quelques mésopores et macropores, la proportion de macropores étant légèrement supérieure à celles des mésopores. D'après les résultats obtenus, l'augmentation du pourcentage d'agent liant favorise la formation de mésopores et de macropores au détriment des micropores. La figure 20 présente l'influence du pourcentage d'HPMC sur la proportion de micropores de chaque échantillon.

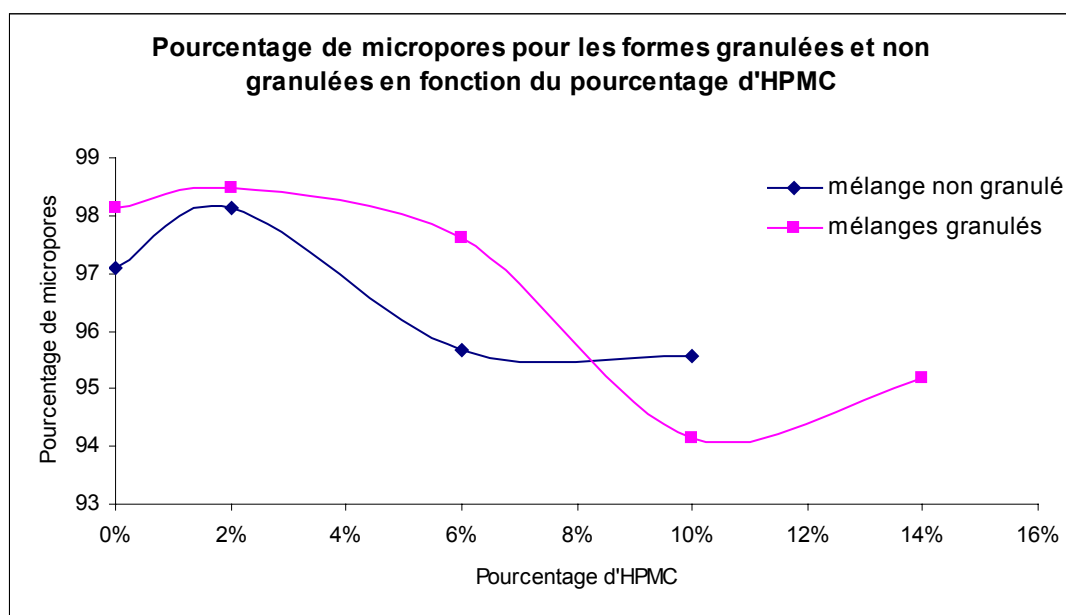


Figure 20 : La microporosité en fonction du pourcentage d'HPMC

Le graphique montre une diminution de la microporosité avec le pourcentage croissant d'HPMC. Cette observation est vérifiée seulement jusqu'à 10 % d'HPMC. Au-delà la microporosité augmente un peu, tout en restant inférieure à celles obtenues par les échantillons à 0, 2 et 6 % d'HPMC. L'HPMC a donc une influence sur la proportion de microporosité de l'échantillon.

Les graphiques de l'annexe I (figure 22 à 31) montrent que les micropores sont compris majoritairement entre 0,1 et 1 μm . Quant aux macropores, leur diamètre est compris entre 100 et 500 μm , ce qui est très favorable pour une repousse osseuse efficace. Ces mêmes graphiques montrent nettement l'augmentation du nombre de macropores au détriment des micropores pour un pourcentage d'HPMC croissant dans la formule. De plus, cette observation paraît plus marquée pour les mélanges granulés. L'ajout d'HPMC au BCP a une influence très positive sur la porosité du biomatériau. Cette influence est d'autant plus bénéfique que le pourcentage d'HPMC est élevé.

5- Cinétique de libération

Les cinétiques de libération ont pour but de montrer :

- si le pourcentage d'agent liant dans la formule influence la libération,
- et si le fait de granuler le mélange a également une influence sur la libération.

Les courbes obtenues ont toutes le même profil : une libération massive durant les premiers jours, puis une phase de plateau. D'après les tableaux de valeurs de l'annexe II, la libération de vancomycine n'apparaît pas avant environ 6 heures. C'est le temps nécessaire pour imprégner les granules et conduire au mouillage des particules pour permettre le relargage de principe actif (Gautier *et al.*, 2000b). Après ce délai, le premier relargage de vancomycine dépasse la concentration de 0,5 mg.L⁻¹ pour atteindre 4 mg.L⁻¹ en moins de 24 heures. La CMI est donc atteinte rapidement et la vancomycine peut être active sur les éventuels germes. Il y a quelques variations selon les échantillons en raison de la répartition de la vancomycine plus ou moins en surface du compact.

Dans notre étude, la plus longue libération est obtenue avec les échantillons à 10 et 14 % d'HPMC, respectivement 97,2 et 96,7 % de vancomycine sont libérés au bout de 8 jours (plateau). Gautier *et al.* ont comparé trois méthodes de mise en forme : la compression isostatique, la compaction dynamique et la granulation humide. L'étude portait sur la libération de vancomycine à partir de granules de BCP. La libération de l'antibiotique à partir de ces granules issues de la granulation humide était complète au bout de 3 jours, contre 4 à 6 jours pour la compaction dynamique (Gautier *et al.*, 2001). Le meilleur résultat fut obtenu avec la compression isostatique, pour une pression de 200 MPa, la vancomycine s'est entièrement libérée en 7 jours (Gautier *et al.*, 2000b). Dans notre cas, nous avons utilisés des petits échantillons de 0,15 à 0,35 g issus d'un bloc d'une dizaine de grammes. Le BCP sans HPMC, pour une compression de 150 MPa, s'est complètement libérée en 2 jours, soit pour une pression plus faible, un temps de libération plus court. Cependant, l'incorporation d'HPMC augmente considérablement les temps de libération jusqu'à 8 jours pour 10 et 14 % d'HPMC de la forme granulée. Les temps de libération sont multipliés par quatre.

Le ralentissement de la libération peut s'expliquer par les propriétés de l'HPMC. En effet, au contact des fluides biologiques, le polymère s'hydrate, entraînant une relaxation de ses chaînes et donc un gonflement du polymère. Notre principe actif étant hydrophile, il va diffuser au travers de ce gel au fur et à mesure de sa formation. Il se libère progressivement dans le milieu par diffusion, (le phénomène d'érosion reste très limité dans le cas de l'HPMC et de PA solubles). Le gonflement des blocs a d'ailleurs pu être visualisé lors de l'expérimentation. Le principe actif est présent sous forme non solubilisée dans le polymère non hydraté (Colombo *et al.*, 1996 ; Bettini *et al.*, 1998, 2001).

D'après les résultats obtenus, l'augmentation du pourcentage d'HPMC au sein du substitut permet de passer de 5,8 à 7 jours pour un pourcentage d'HPMC de 2 et 10 %, dans le cas des mélanges non granulés. Pour les mélanges granulés, avec 2 % d'HPMC, la vancomycine se libère en 6,47 jours contre 8 jours pour 14 % d'HPMC. Ces résultats sont corrélés avec ceux de Gao (1996) qui avait démontré que l'augmentation du pourcentage d'HPMC au sein d'un comprimé matriciel permettait de prolonger la libération du principe actif associé. Dans son étude, 75 % du PA était libéré en 6 heures pour un faible pourcentage d'HPMC contre 14 heures pour un pourcentage supérieur. Alderman avait également observé le même phénomène dès 1984.

D'après les graphiques 16, 17 et 18, il paraît n'y avoir que très peu de différences entre les mélanges granulés et non granulés, en ce qui concerne les temps de libération de la vancomycine.

La figure 21 présente l'influence du pourcentage d'HPMC sur les temps de libération de la vancomycine associé au BCP.

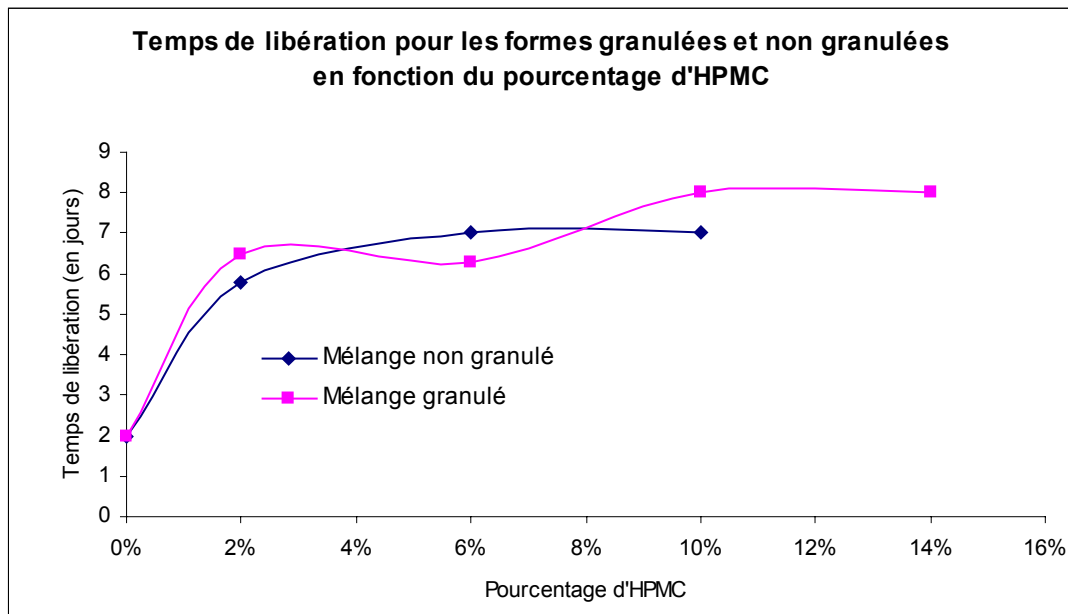


Figure 21 : Les temps de libération en fonction du pourcentage d'HPMC

Ce graphique montre qu'à partir de 2% d'HPMC, le temps de libération de la vancomycine est multiplié par 3. Cependant, les pourcentages croissants d'HPMC ne jouent que très peu sur le temps de libération. La vancomycine est libérée en 8 jours pour 14 % d'HPMC, contre 6 jours avec seulement 2 % d'HPMC. D'autre part, il est difficile pour l'instant de conclure à une influence de la granulation sur la libération de la vancomycine.

Ce graphique confirme les observations faites précédemment, c'est-à-dire que le temps de libération est augmenté avec l'incorporation d'HPMC quel que soit le pourcentage ajouté. La variation reste faible avec un pourcentage croissant d'HPMC. Et enfin, la granulation ne semble pas indispensable pour prolonger les temps de libération.

L'ajout d'HPMC au BCP permet de modifier le profil de libération de la vancomycine ; sans HPMC la vancomycine est libérée massivement durant les deux premiers jours. En présence d'HPMC, la vancomycine est libérée de manière plus progressive au cours des 4 premiers jours avant d'atteindre un plateau au bout de 6 à 8 jours selon le pourcentage d'HPMC associé. L'incorporation d'HPMC au sein du mélange BCP/Vancomycine permet de prolonger la libération de l'antibiotique de 2 à 6-8 jours (selon le pourcentage d'HPMC associé). Par contre, entre 2 % et 14 % d'HPMC ajouté, les temps sont prolongés seulement de 2 jours.

CONCLUSION

Les objectifs de l'étude étaient de vérifier :

- si l'ajout d'un agent liant dans un matériau de comblement osseux permettait de ralentir et de prolonger la libération d'un principe actif,
- si le protocole de mise en forme (avec ou sans granulation avant la compression isostatique) influençait également cette libération.

Les résultats de cette étude montrent que l'ajout d'HPMC, en comparaison à une forme sans HPMC, permet d'augmenter considérablement le temps de libération du principe actif associé. Cependant, la proportion d'HPMC ajouté au mélange n'a qu'une très faible influence sur les essais de libération de la vancomycine. La libération est prolongée de 6 à 8 jours entre 2 % et 14 % d'HPMC. Quant à l'opération de granulation, elle ne semble pas intervenir sur ces temps de libération.

De plus, ce procédé de mise en forme par compression isostatique a permis d'obtenir des compacts ayant une porosité satisfaisante. Le pourcentage important de micropores permet une bonne circulation des fluides biologiques, tandis que les macropores favorisent la pénétration des cellules facilitant ainsi la repousse osseuse. L'ajout d'HPMC dans la formulation du substitut osseux a permis néanmoins d'augmenter le pourcentage de mésopores et de macropores au profit des micropores. L'agent liant a conduit également à l'augmentation de la dureté des compacts, ce qui favorise leur implantation ainsi que leur maintien dans la cavité osseuse.

Les résultats de cette étude permettent ainsi la préparation et la mise à disposition des cliniciens de différents matériaux dont les caractéristiques sont très différentes et parfaitement maîtrisées. Le clinicien pourra donc, en fonction des critères déterminés, choisir le matériau dont les caractéristiques lui conviennent le mieux. L'ajout d'un agent liant de façon contrôlée permet la préparation de matériau dont la dureté peut être augmentée en parallèle d'une porosité satisfaisante. De plus, l'incorporation d'un faible pourcentage d'HPMC permet d'améliorer nettement les temps de libération. Au contraire, l'opération de granulation ne paraît pas nécessaire. Il serait intéressant de déterminer par la suite le pourcentage optimal d'HPMC à ajouter au BCP pour permettre de prolonger les temps de libération tout en conservant une dureté et une porosité satisfaisante.

BIBLIOGRAPHIE

Aeschlimann JR, Rybak MJ. Pharmacodynamic analysis of the activity of Quinupristin-Dalfopristin against Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agent Chemother*, 1998; 42 : 2188-2192

Alderman A. A review of cellulose ethers in hydrophilic matrices for oral controlled-release dosage forms. *Int J Pharm Tech & Prod*, 1984 ; 5 : 1-9.

Allen N, Nicas TI. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 2003 ; 26 : 511-532.

Aulton ME. Pharmaceutics, the science of dosage form design. *Edition Churchill Pivingstone*, 1988 ;616-622.

Bajpai PK, Benghuzzi HA. Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and biologicals. *J Biomed Mater Res*, 1988 ; 22 :1245-1266.

Balny C, Heremans K, Masson P. Haute pression et biologie: une démarche d'avenir. *Biofutur*, Mai 1992 ; 37-42.

Barlow GG. The granulation of powders. *The Chemical Engineer*, 1968; 220.

Bettini R, Catellani PL, Peppas NA, Colombo P. Interpretation of drug release kinetics and drug concentration profiles in HPMC gels. *Proc. 2nd World meeting APGI/APV, Paris, 25/28 May 1998* : 327-328.

Bettini R, Catellani PL, Santi P, Massimo G, Peppas NA, Colombo P. Translocation of drug solubility and influence on release rate. *J Control Release*, 2001 ; 70 : 383-391.

Bohner M, Lemaitre J, Van Landuyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci*, 1997 ; 86 (5) : 565-571.

Bohner M, Lemaître J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci*, 2000 ; 89 (10) : 1262-1270.

Bonten MJC, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they, and where do they come from? *Lancet*, 2001 ; 1 : 314-325.

Brasnu D, Roux F, Loty B, Laccourreye H. Le corail : un nouveau procédé de reconstruction crânio-faciale. *Ann Oto-Laryng*, 1988 ; 105 : 431-3.

Brisson-Noël A, Dutka-Malen S, Molinas C, Leclercq R, Courvalin P. Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant van-A encoding high level resistance to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990 ; 34 : 924-7.

Brouard S, Lelan J, Lancien G, Bonnaure M, Cormier M, Langlais F. Phosphate tricalcique, vecteur d'antibiotiques: gentamicine et vancomycine. Caractérisation physicochimique in vitro, étude de la porosité du biomatériau et du relargage de la gentamicine et de la vancomycine. *Chirurgie*, 1997 ; 122 : 397-403.

Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 2000 ; 21 : 1291-1298.

Colombo P, Bettini R, Santi P, De Ascentiis A, Peppas NA. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *J Control Release*, 1996 ; 39 : 231-237.

Colombo P, Bettini R, Catellani PL, Santi P, Peppas NA. Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug. *Eur J Pharm Scis*, 1999 ; 9: 33-40.

Colorcon, Dow Chemical Company. 2003.

http://www.colorcon.com/pharma/mod_rel/literature/MR_lit_methocel2.html

Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué 2003 (édition de Janvier 2003). <http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2>

Daculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 1990 ; 11 : 86-87.

Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*, 1998 ; 19 : 1473-1478.

Dorozhkin SV. Is there a chemical interaction between calcium phosphates and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in organic/inorganic composites? *J Biomed Mater Res*, 2001 ; 54 : 247-255.

Ebube NK, Hikal AH, Wyandt CM, Beer DC, Miller LG, Jones AB. Effect of drug, formulation and process variables on granulation and compaction characteristics of heterogeneous matrices. Part 1: HPMC and HPC systems. *Int J Pharm*, 1997 ; 156 : 49-57.

Fricain JC, Alouf J, Bareille R, Rouais F, Rouvillain JL. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral *porites astrides*. *Biomaterials*, 2002 ; 23 : 673-679.

Fromtling A, Castaner J. LY-333328. *Drugs Fut*, 1998 ; 23 : 17-23.

Gao P, Meury RH. Swelling of Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix Tablets. Mechanistic study of the influence of formulation variables on matrix performance and drug release. *J Pharm Sci*, 1996 ; 85 (7) : 732-739.

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone in growth. *Biomaterials*, 1998 ; 19 : 133-139.

Gautier H, Guicheux J, Grimandi G, Faivre-Chauvet A, Daculsi G, Merle C. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. *J Biomed Mater Res*, 1998 ; 40 : 606-613.

Gautier H, Caillon J, Le Ray AM, Daculsi G, Merle C. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device. *J Biomedical Mater Res*, 2000a ; 52 : 308-314.

Gautier H, Merle C, Auget JL, Daculsi G. Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method. *Biomaterials*, 2000b ; 21: 243-249.

Gautier H, Daculsi G, Merle C Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: *in vitro* characterization and microbiological activity. *Biomaterials*, 2001 ; 22 : 2481-2487.

GESTO. Association pour l'étude des greffes et des substituts osseux, substituts tissulaires en orthopédie, Société française de chirurgie orthopédique et traumatologique. Mise à jour 1997. <http://www.maitrise-orthop.com/gesto/> ; Dr Mainard.

Hardwood RJ. Hydroxypropylmethylcellulose, *In: Handbook of Pharmaceutical Excipients*, edited by Kibbe HA, APhA, Washington, PhP, London, third Edition, 2000, 252-255..

Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet*, 2001; 1 : 147-155.

Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1995 ; 16 : 105-13.

Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E, Katagiri Y. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J Biomed Mater Res*, 1998a ; 39 : 536-538.

Itokazu M, Yang W, Aoki T, Ohara A, Kato N. Synthesis of antibiotic-loaded interporous hydroxyapatite blocks by vacuum method and *in vitro* drug release testing. *Biomaterials*, 1998b ; 19 : 817-819.

IUPAC. Recommendations 1984 : Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierrotti RA, Roquerol J, Siemieniowska T, Reporting Physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Appl Chem*, 1985 ; 4 : 603-619.

Khan GM, Zhu JB. Ibuprofen release kinetics from controlled-release tablets granulated with aqueous polymeric dispersion of ethylcellulose II: Influence of several parameters and coexcipients. *J Control Release*, 1998 ; 56 : 127-134.

Kimakhe S, Bohic S, Larrose C, Reynaud A, Pilet P, Giumelli B, Heymann D, Daculsi G. Biological activities of sustained polymyxin B release from calcium phosphate biomaterial prepared by dynamic compaction: an in vitro study. *J Biomedical Mater Res*, 1999 ; 47 : 18-27.

Klinger GH, Ghali ES, Porter SC, Schwartz JB. For controlled release matrices by granulation with a polymer dispersion. *Drug Dev Ind Pharm*, 1990 ; 16 (9) : 1473-1490.

Kremmery V Jr, Sefton A. Vancomycin resistance in gram-positive bacteria other than *Enterococcus* spp. *Int J Antimicro Agents*, 2000 ; 14 : 99-105.

Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Huet H, Laurent A, Milet C Lopez E. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone*, August 1999 ; 25 (n° 2 supplement) : 91S-94S.

Leclercq R, Derlot E, Weber M, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *E. faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989 ; 33 : 10-5.

Leclercq R. Résistance bactérienne aux glycopeptides. *Med Ther*, 1997 ; 3 : 77-85.

Legros R. Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés. Institut national polytechnique de Toulouse, 1984.

Léone M, Ayem ML, Martin C. Les glycopeptides, revue générale. *Ann Fr Anesth Réanim*, 2000 ; 19 : 177-87.

Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, Thierry B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. *J Mater Sci: Mater Med*, 1999 ; 10 : 11-120.

Maillet M. Les tissus de soutien. Dans : *Histologie et histophysiologies humaine, tome 3*. Edition Vigot, Paris, 1979 : 51-65.

Nagao H, Tachikawa T, Miki T, Oda M, Mori M, Takahashi K Enomoto S. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs. *Int J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2002 ; 31 : 66-72.

Newitt DM, Conway Jones JM. A contribution to the theory and practice of granulation. *Trans Inst Chem Engrs*, 1958 ; 36 : 422.

Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin resistance genes from *Enterococcus faecalis* NTCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992 ; 93 : 195-8.

Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler JM. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and *in vitro* activity of vancomycin. *Biomaterials*, 2003 ; 24 : 1265-1270.

Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe, Strasbourg, 4ème Edition, 2002.

Pouliquen JC, Noat M, Verneret C, Guillemin G, Patat JL. Le corail substitué à l'apport osseux dans l'arthrodèse vertébrale postérieure chez l'enfant. Premiers résultats. *Rev Chir Orthop*, 1989 ; 75 : 360-9.

Prat-Poiret N, Langlais F, Bonnaure M, Cormier M, Lancien G. Phosphate tricalcique et gentamycine. Diffusion de l'antibiotique *in vitro* et *in vivo*, réhabilitation en site osseux chez le mouton. *Chirurgie*, 1996 ; 121 : 298-308.

Rabadji-Siahboomi AR, Botwell RW, Mansfield P, Henderson A, Davies MC, Melia CD. Structure and behaviour in hydrophilic matrix sustained release dosage forms: 2. NMR-imaging studies of dimensional changes in the gel layer and core of HPMC tablets undergoing hydration. *J Control Release*, 1994 ; 31 : 121-128.

Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*, 1997 ; 18 : 777-782.

Raymond J, Bergeret M, Gendrel D. Impact de la résistance bactérienne sur les infections graves. *Arch Pediatr*, 2001 ; 8 (4) : 697-704.

Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials*, 1990 ; 11 : 13-15.

Ries MD. Vancomycin-resistant Enterococcus infected total knee arthroplasty. *J Arthr*, 2001 ; 16 (6) : 802-805.

Robert TC, Nixon PR, Patel MV. Drug release from hydrophilic matrices. 1. New scaling laws for predicting polymer and drug release based on the polymer disentanglement concentration and the diffusion layer. *J Pharm Sci*, 1995 ; 12 : 1455-1463.

Rumpf H. The strength of granules and agglomerates. *Agglomeration. Edition WA Knepper. Intersciences, New York, 1962 ; p.379.*

Siepmann J, Streubel A, Peppas NA. Understanding and predicting drug delivery from hydrophilic matrix tablets using the “sequential layer” model. *Pharm Res*, 2002 ; 19 : 306-313.

Sieradzki K, Roberts RB, Stuart WH, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med*, 1999 ; 340 : 517-523.

Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR *et al.*. Emergence of vancomycin resistance in *staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, 1999 ; 340 : 493-501.

Talon D, Bertrand X, Thouverez M. Facteurs de risque et prévention de l'acquisition et de la transmission des entérocoques résistants aux glycopeptides. *Pathol Biol*, 2001 ; 49 : 641-8.

Toth JM, Hirth WM, Hubbard WG, Brantley WA, Lynch KL. Determination of the ratio of HA/TCP mixtures by X-ray diffraction. *J Appl. Biomater*, 1991 ; 2 : 37-40.

Uchida A, Shinto Y, araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthop Res*, 1992 ; 10 : 440-445.

USP XXVI, the United States Pharmacopeia, 26th edition, January 1, 2003, Rockville, United states pharmacopeial.

Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, Georges RC. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet*, 1988 ; 331 : 136.

Vidal 2002, le dictionnaire, 78^{ème} édition, Edition du Vidal. La Vancocine®, p 2306.

Vu TO, Galet L, Fages J, Oulahna D. Improving the dispersion kinetics of a cocoa powder by size enlargement. *Powder Technol*, 2003 ; 130 (1-3) : 400-406 .

Weiss P, Gauthier O, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone*, 1999 ; 25 (2) : 67S-70S.

Xu G, Fang F, Zhang R, Sunada H. Granulation of aspirin sustained-release formulation with hydroxypropylmethylcellulose as rate-controlling agent. *Drug Dev Ind Pharm*, 1997 ; 23 (11) : 1105-1110.

Yaylaoglu MB, Korkusuz P, Örs Ü, Korkusuz F, Hasirci V. Development of calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. *Biomaterials*, 1999 ; 20 : 711-719.

Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, Zhan, X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs : a comparative study between porous α -TCP and β -TCP. *J Mater Sci : Mater Med*, 2001a ; 12 : 7-13.

Yuan H, Yang Z, De Bruijn JD, De Groot K, Zhang X. Material-dependant bone induction by calcium phosphate ceramics: a 2,5 year study in dog. *Biomaterials*, 2001b ; 22 : 2617-2623.

Zema L, Sangalli ME, Maroni A, Vecchio C, Giordano F, Gazzaniga A. Influence of drug solubility on the release from high viscosity HPMC matrices. *Proc. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, 3/6 April 2000, p. 213-214.*

Cette liste répertorie 80 références bibliographiques.

Annexe I : Répartition de la porosité pour chaque échantillon

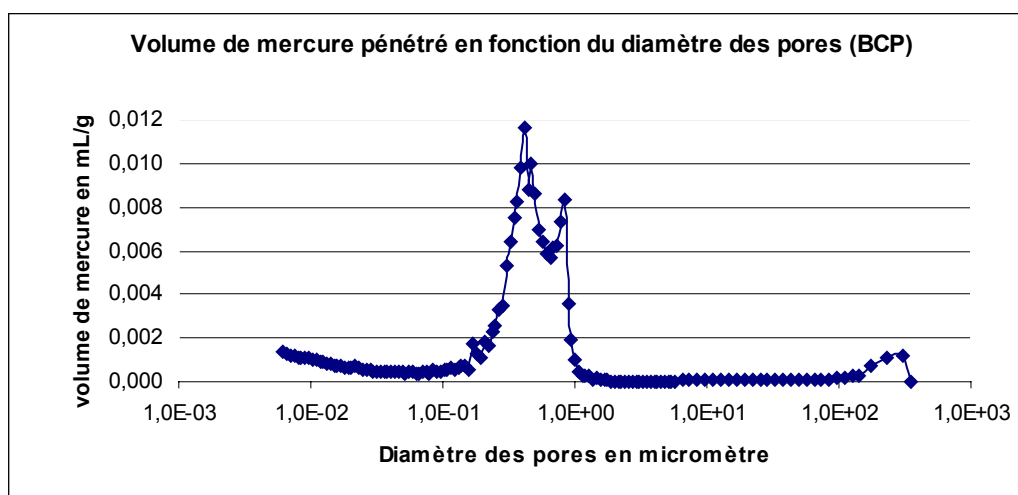


Figure 22: Répartition de la porosité pour le BCP non granulé

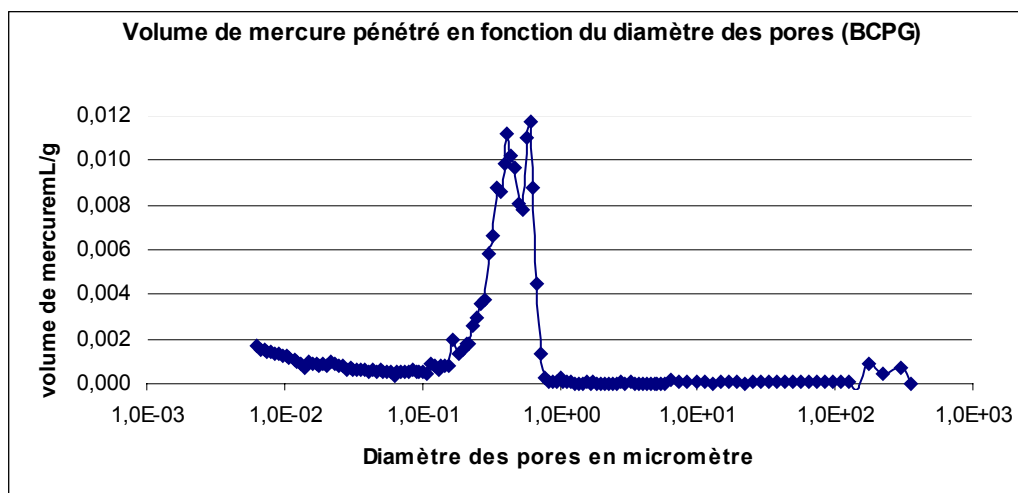


Figure 23 : Répartition de la porosité pour le BCP granulé

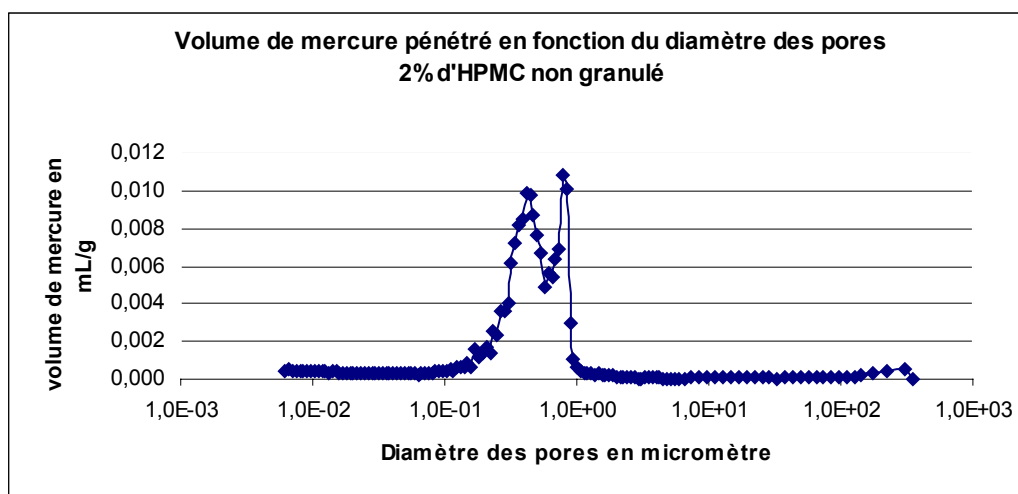


Figure 24 : Répartition de la porosité pour le mélange non granulé à 2 % d'HPMC

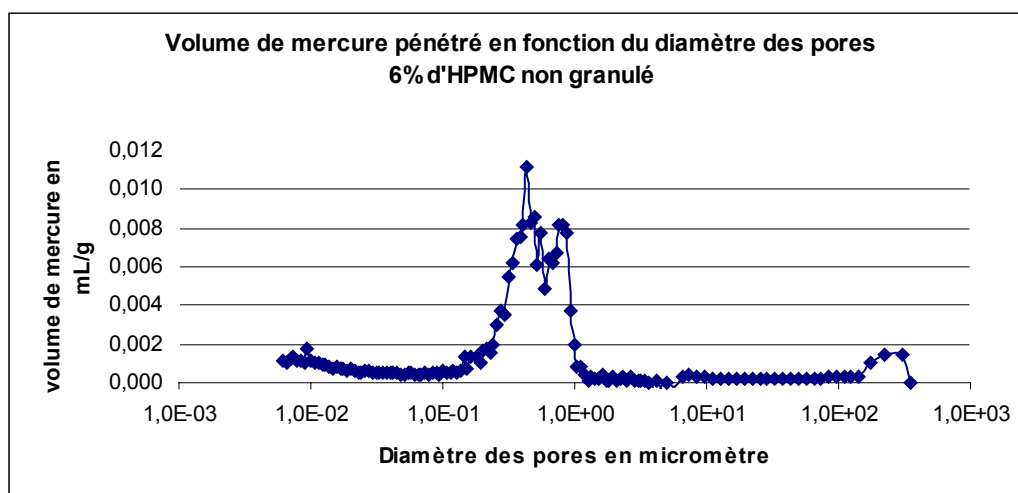


Figure 25 : Répartition de la porosité pour le mélange non granulé à 6 % d'HPMC

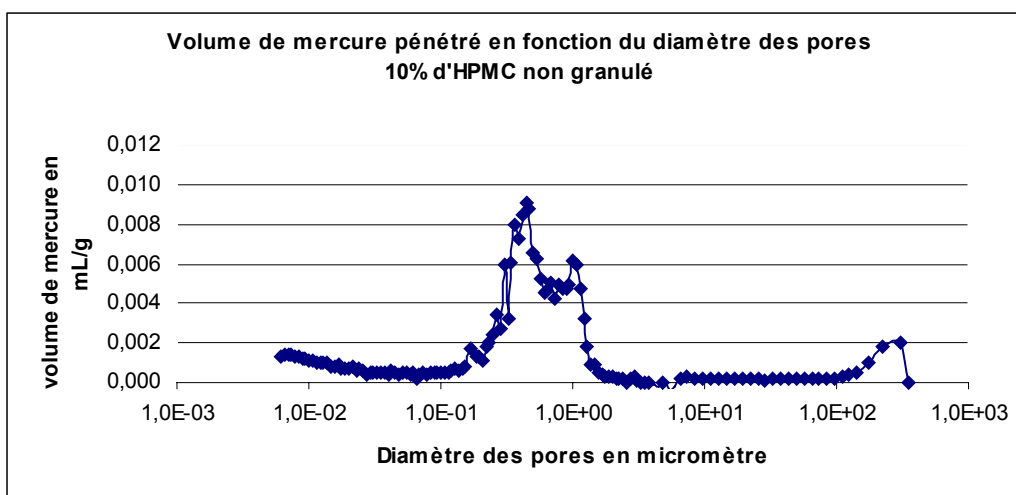


Figure 26 : Répartition de la porosité pour le mélange non granulé à 10 % d'HPMC

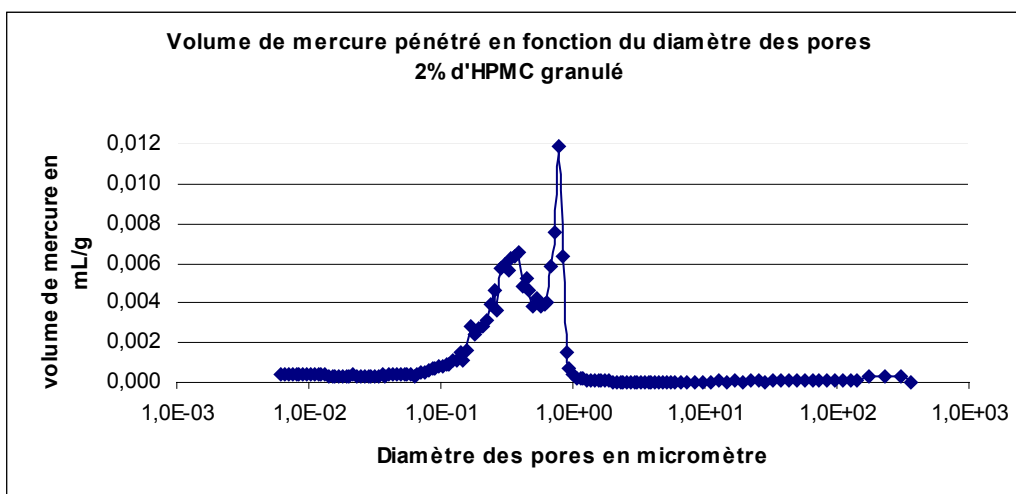


Figure 27 : Répartition de la porosité pour le mélange granulé à 2 % d'HPMC

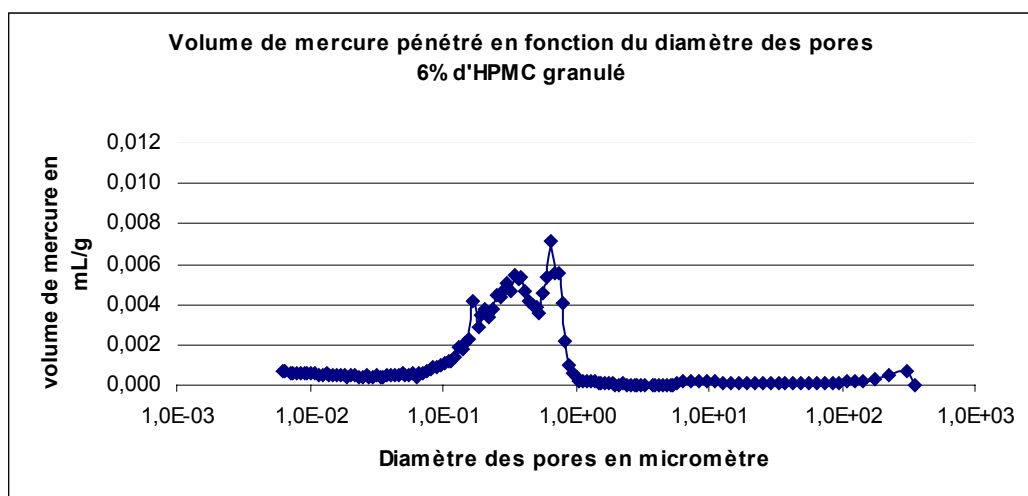


Figure 29 : Répartition de la porosité pour le mélange granulé à 6 % d'HPMC

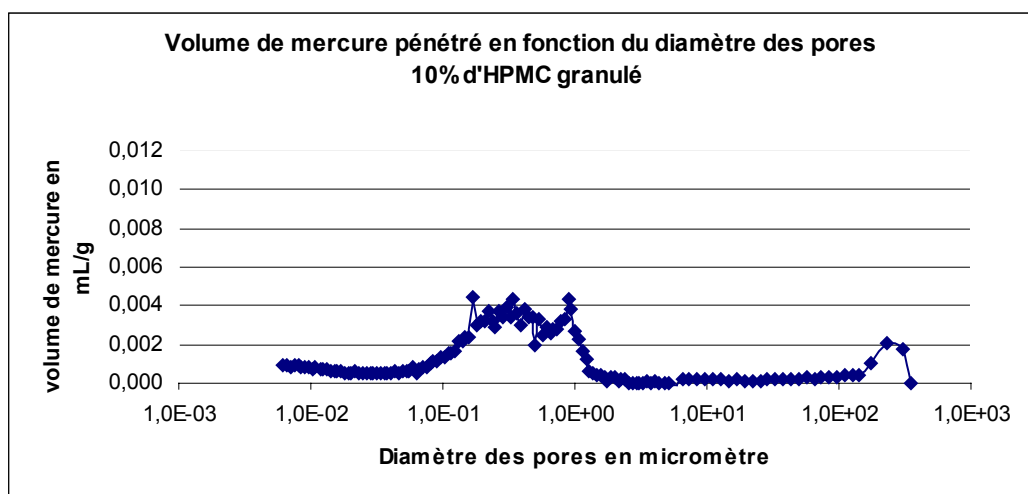


Figure 30 : Répartition de la porosité pour le mélange granulé à 10 % d'HPMC

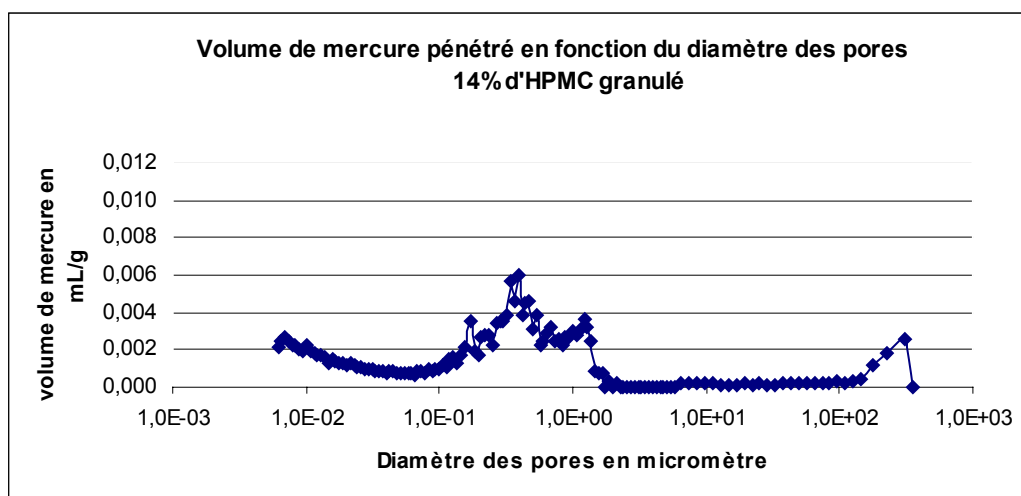


Figure 31 : Répartition de la porosité pour le mélange granulé à 14 % d'HPMC

Annexe II : Valeurs numériques des courbes de libération

temps en jours	Pourcentage moyen de vancomycine libérée	
	BCP granulé (n=3)	BCP non granulé (n=3)
0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,04	0,30 ± 0,29	0,50 ± 0,06
0,08	0,30 ± 0,29	0,55 ± 0,06
0,13	0,30 ± 0,29	0,56 ± 0,07
0,20	---	0,61 ± 0,07
0,21	6,70 ± 9,33	---
0,28	---	2,36 ± 1,71
0,35	20,70 ± 29,13	---
1,00	93,33 ± 2,30	81,56 ± 7,70
2,00	100,05 ± 1,95	97,35 ± 2,44
3,00	100,21 ± 2,07	98,24 ± 2,98
4,00	101,23 ± 2,04	98,44 ± 3,06

Tableau 11 : Valeurs numériques des courbes de libération pour les deux témoins granulés et non granulés

temps en jours	Pourcentage moyen de vancomycine libérée mélanges simples d'HPMC et de BCP		
	2 % HPMC (n=3)	6 % HPMC (n=3)	10 % HPMC (n=2)
0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,04	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03
0,08	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,04
0,17	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,06 ± 0,04
0,25	0,74 ± 0,93	0,26 ± 0,12	0,33 ± 0,19
1,00	18,16 ± 25,30	7,13 ± 9,60	10,70 ± 10,40
2,00	54,93 ± 22,37	46,82 ± 12,83	25,15 ± 22,86
3,00	84,38 ± 13,28	70,53 ± 7,51	60,00 ± 14,15
4,24	95,56 ± 8,57	82,13 ± 4,64	83,59 ± 4,21
6,00	101,28 ± 4,87	92,68 ± 5,65	98,31 ± 3,76
7,00	102,21 ± 4,14	94,09 ± 4,83	100,10 ± 3,74
8,00	102,81 ± 3,81	94,86 ± 4,14	100,76 ± 3,33

Tableau 12 : Valeurs numériques des courbes de libération pour les mélanges non granulés

Pourcentage de vancomycine libérée mélange d'HPMC et de BCP granulé				
temps en jours	2 % HPMC (n=3)	6 % HPMC (n=3)	10 % HPMC (n=3)	14 % HPMC (n=3)
0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,04	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,36	0,98 ± 0,18	0,27 ± 0,14
0,08	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,36	1,02 ± 0,19	0,33 ± 0,19
0,12	---	0,26 ± 0,36	1,03 ± 0,20	0,36 ± 0,20
0,17	0,01 ± 0,01	---	---	---
0,21	---	0,26 ± 0,36	1,49 ± 0,38	1,18 ± 0,81
0,25	0,03 ± 0,03	---	---	---
0,28	---	---	2,91 ± 1,45	2,94 ± 1,87
0,31	---	0,26 ± 0,36	---	---
1,00	14,54 ± 5,05	5,86 ± 4,97	25,50 ± 6,14	17,68 ± 8,37
2,00	61,87 ± 7,76	35,53 ± 24,68	50,64 ± 12,58	39,33 ± 10,25
3,00	77,16 ± 4,53	74,23 ± 17,29	73,23 ± 6,11	59,96 ± 22,72
4,00		87,55 ± 8,58	89,37 ± 12,89	86,84 ± 15,78
4,24	84,58 ± 3,84	---	---	---
5,00	---	91,93 ± 3,92	---	---
6,00	8,13 ± 2,41	---	---	---
6,29	---	92,43 ± 3,64	---	---
7,00	89,05 ± 1,64	---	94,42 ± 14,17	94,19 ± 19,64
7,10	---	92,50 ± 3,57	---	---
7,96	---	92,51 ± 3,56	---	---
8,00	89,28 ± 1,59	---	95,14 ± 14,42	97,18 ± 20,51

Tableau 13: Valeurs numériques des courbes de libération pour les mélanges granulés

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, Le Directeur de l'U.E.R

Nom - Prénoms : MIGNÉ Laetitia, Claire, Thérèse

Titre de la thèse : Modulation de la libération de vancomycine par adjonction d'agent liant dans des matériaux de comblement osseux préparés par compression isostatique.

Résumé :

Les substituts osseux sont largement utilisés depuis une dizaine d'années en odontologie, orthopédie et chirurgie maxillo-faciale. A l'origine, ils ont été créés pour combler les défauts osseux survenus à la suite de traumatismes ou de maladies. Les céramiques phosphocalciques se révèlent être les meilleurs candidats pour cette substitution, de part leur composition très voisine de celle de l'os humain. Suite au développement de ces biomatériaux, l'incorporation d'un principe actif (PA) au substitut osseux est devenue un nouveau challenge. Le PA peut ainsi être relargué par diffusion *in situ* au niveau du site d'implantation, ceci dans un but prophylactique ou thérapeutique. Dans cette étude la mise en forme du phosphate de calcium biphasé, (BCP : *biphasic calcium phosphate*) est réalisée par compression isostatique. Ce procédé permet d'incorporer un antibiotique : la vancomycine sans dégradation de la molécule au sein du matériau. L'addition d'un agent liant, l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) à cette préparation associée ou non à une granulation humide, permet de retarder de six jours la libération de l'antibiotique.

Mots clés :

Substitut osseux – Céramiques phosphocalciques – Vancomycine – Hydroxypropylméthylcellulose – Compression isostatique – Granulation humide.

Jury :

Président : Mr Christian MERLE, Professeur de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, Nantes.

Assesseurs : Mme Hélène GAUTIER, Maître de Conférence de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, Nantes.

Mr Jean Michel BOULER, Maître de Conférence en Chimie des Matériaux, Faculté de Chirurgie dentaire, Nantes.

Adresse de l'auteur : Mademoiselle Laetitia MIGNÉ

1, rue Chevillon
85190 La Genétouze