

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R DE PHARMACIE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES

Ecole doctorale de Chimie-Biologie

Discipline : Sciences Pharmaceutiques
Spécialité : Pharmacie Galénique

Présentée et soutenue publiquement le
2 mai 2006

par

Antoine LECOMTE

**MISE AU POINT DES TECHNIQUES D'ANALYSE,
MAITRISE ET OPTIMISATION DE L'ARCHITECTURE
POREUSE INTERCONNECTEE DES CERAMIQUES
PHOSPHOCALCIQUES BIPHASEES**

Devant le jury ci-dessous

Président :

Monsieur le Professeur Alain TRUCHAUD - Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nantes

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur Patrice HILDGEN - Université de Montréal

Monsieur le Professeur Dominique PIOLETTI - Ecole Polytechnique de Lausanne

Examineurs :

Monsieur le Professeur Jean-Michel BOULER (Co-Directeur de thèse) – UMR 791 - Faculté d'Odontologie de Nantes

Monsieur le Docteur Pierre LAYROLLE - Chargé de Recherche – UMR 791 - Faculté d'Odontologie de Nantes

Membre invité:

Monsieur le Docteur Pierre WEISS - MCU – UMR 791 - Faculté d'Odontologie de Nantes

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Christian MERLE – Laboratoire de Pharmacie Galénique - Faculté de Pharmacie de Nantes

Table des matières

<i>Introduction</i>	7
<i>Partie 1 : Tissus et substituts osseux : généralités</i>	9
1- Définitions, propriétés	9
1.1- Le tissu osseux	9
1.1.1- Structure du tissu osseux	10
1.1.1.1- Texture :	10
1.1.1.2- Architecture :	10
1.1.2- Les cellules osseuses	11
1.1.2.1- Les ostéoclastes	11
1.1.2.2- Les ostéoblastes	11
1.1.2.3- Les ostéocytes	11
1.1.3- La matrice extra cellulaire	12
1.1.3.1- La trame protéique :	12
1.1.3.2- Fibres de collagène	12
1.1.3.3- Substance fondamentale inter fibrillaire :	12
1.1.4- Phase minérale :	13
1.1.4.1- Composition :	13
1.1.4.2- Structure	13
1.2- Remodelage osseux :	14
1.3- Cicatrisation osseuse	15
2- Les greffes osseuses	15
2.1- Autogreffe :	15
2.2- Allogreffes	16
2.3- Xénogreffe	17
3- Cahier des charges des substituts osseux	17
3.1- Indications cliniques des substituts osseux	20
3.2- Principaux matériaux de substitution osseuse	20
3.2.1- Matériaux d'origine biologique	20
3.2.1.1- Substituts osseux d'origine bovine	20
3.2.1.2- Substituts osseux d'origine corallienne	21
3.2.2- Ciments ioniques, hydrauliques et acryliques :	22
3.2.2.1- Les ciments ioniques ou hydrauliques	22
3.2.2.2- Les ciments acryliques	22
3.2.3- Verres biologiques	23
3.2.3- Céramiques phosphocalciques	23
3.2.3.1- Hydroxyapatite :	23
3.2.3.2- Phosphate tricalcique bêta	24
3.2.3.3- Céramiques phosphocalciques biphasées :	24
3.2.4- Propriétés biologiques des BCP	26
3.2.5- Interconnexion et porosité interconnectée	27
Propriétés mécaniques	28
3.2.6- Principales céramiques phosphocalciques biphasées commercialisées	29
3.2.7- Les céramiques injectables :	30
<i>Partie 2 : Développement de techniques d'étude de l'architecture poreuse interconnectée</i> 31	

1– Aspects théoriques et mise au point des techniques d'étude de l'architecture poreuse interconnectée des BCP	31
1.1- Mise au point des techniques d'études de l'interconnexion des BCP	31
1.1.1 – Matériels et méthodes :	32
1.1.1.1 – Matériels utilisés :	32
1.1.1.2 – Méthodes d'analyse :	33
1.2- Conclusion :	63
2 - Application des techniques d'étude de la porosité interconnectée aux principales céramiques biphasées disponibles sur le marché Français.....	64
2.1- Matériels et méthodes :	64
2.1.1- échantillons de céramiques phosphocalciques biphasées :	64
2.1.2- Méthodes d'analyse :	66
3- Résultats des paramètres de porosité des céramiques phosphocalciques biphasées commercialisées sur le marché Français	67
3.1- Mesure de la perméabilité (perméamètre à pression constante)	67
3.2- Détermination du facteur de tortuosité :	68
3.3- Résultats de l'étude de la porosité des BCP	71
3.3.1- Porosité de l'échantillon déterminée par porosimétrie à mercure.....	71
3.3.2- Porosité de l'échantillon déterminée par pycnométrie à hélium.....	72
3.3.3- Etude de la répartition de la porosité en classes de pores par porosimétrie à mercure.....	74
3.3.4- Etude des paramètres d'interconnexion à l'aide du logiciel Pore Cor® : Analyse des courbes d'intrusion de mercure.....	74
Courbes d'intrusion possédant un point d'inflexion	75
Courbes d'intrusion possédant deux points d'inflexion :	75
Courbes d'intrusion possédant trois points d'inflexion.....	77
3.3.5- Analyse des perméabilités et diamètres des canaux d'interconnexion (D ₅₀) fournis par le logiciel Pore Cor	79
3.3.6- Calcul des facteurs de tortuosité à l'aide du logiciel Pore Cor®	80
3.3.7- Modélisation des volumes poreux à l'aide du logiciel Pore Cor®	81
3.4- Conclusion	86
<i>Partie 3 : identification et optimisation des paramètres de fabrication contrôlant l'architecture poreuse interconnectée</i>	88
1- Procédés de fabrication des céramiques phosphocalcique biphasée.....	89
1.1- Les composants de départ :	89
1.1.1- Préparation des poudres	89
1.1.1.1- Poudre de phosphate de calcium :	89
1.1.1.2- Naphtalène :	89
1.1.1.3- Nouveaux porogènes :	91
1.1.2- Mise en forme :	92
1.1.3- Traitement thermique et frittage	93
1.2- Optimisation de la porosité interconnectée :	94
2- Matériels et méthodes	95
2.1- Les poudres	95
2.1.1- Apatite déficiente en calcium :	95
2.1.2- Porogènes :	95
2.1.3- Mélange.....	96
2.2- Formulation des mélanges :	96

2.2.3- Traitement thermique :	96
3- Résultats :	98
3.1- Perméabilité	98
3.2- Tortuosité	98
3.3- Porosité et porogramme	99
3.3.2- Profils d'intrusion de mercure	100
3.3.2.1- Céramiques A1 et A2	100
3.3.2.2- Céramiques A3 et A4	101
3.3.2.3- Céramiques A5 et A6	101
3.3.2.4- Céramiques A7 et A8	102
3.3.3- Perméabilités fractionnées	103
3.3.4- Diamètres équivalent des canaux d'interconnexion :	103
3.3.4- Modélisations Pore Core	103
4- Discussion	105
4.1- Influence du type de CDA :	105
4.2- Influence de la proportion en porogène :	106
4.2.1- Influence sur la porosité :	106
4.2.2- Influence sur la perméabilité :	106
4.2.2.1- Perméabilité globale :	106
4.2.2.2- Perméabilités fractionnées :	106
4.2.3- Influence sur la Tortuosité :	107
4.2.4- Influence sur D50 :	108
4.2.5 Influence sur les modélisations 3D :	108
4.3- Influence du ratio Naphtalène / Saccharose (N/S) :	108
4.3.1- Influence sur la porosité :	108
4.3.2- Influence sur la perméabilité :	109
4.3.2.1 Perméabilité globale :	109
4.3.2- Influence sur le facteur de tortuosité :	110
4.3.3- Influence sur le D50 :	110
4.3.4 Influence sur les modélisations 3D :	110
4.4- Conclusion	111
Partie 4 : Rôle du saccharose dans l'optimisation de l'architecture poreuse interconnectée	112
1- Introduction	112
2- Matériels et méthodes	113
2.1-Matériels :	113
2.2- Méthodes	114
3- Résultats :	114
3.1- Perméabilité	114
3.2- Tortuosité	114
3.3- Porosité et porogramme	115
3.4- Profils d'intrusion de mercure	116
3.4.1- Céramique B1 (N/S = 6 : 0)	116
3.4.2- Céramiques B2 (N/S = 5 : 1) et B3 (N/S = 4 : 2)	117
3.4.3- Céramiques B4 (N/S = 3 : 3), B5 (N/S = 2 : 4) & B6 (N/S = 1 : 5)	118
3.4.4- Céramique B7 (N/S = 0 : 6)	119
3.5- Perméabilités fractionnées	119
3.6- Diamètres équivalent des canaux d'interconnexion :	120

3.7- Modélisations Pore Core	122
4- Discussion.....	123
4.1- Optimisation de l'architecture poreuse :	123
4.2- Naphtalène et saccharose : quel impact sur l'architecture poreuse ?	123
4.2.1- Une association synergique.....	123
4.2.2- Mode de création de l'interconnexion	125
4.2.2.1- Céramique formulée à partir de naphtalène :	125
4.2.2.2- Céramiques formulées à partir d'un mélange naphtalène/saccharose:	126
4.2.2.2- Céramique formulée à partir de saccharose	127
4.3- Conclusion	127
Partie 5 : Evaluation et optimisation de la cytocompatibilité d'une céramique à architecture poreuse interconnectée (A4)	129
1- Etude de la cytocompatibilité in vitro de la céramique A4	130
1.1- Matériels et méthodes:	130
1.1.1- Granules de céramiques	130
1.1.2- Le milieu de culture	130
1.1.3- Le support (plastique) de culture	131
1.1.3.1- En absence de granules de MBCP® ou de A4 (phase d'amplification des cellules)	131
1.1.3.2- En présence du MBCP® ou de A4 (étude de cytocompatibilité).....	131
1.1.2- Cultures cellulaires.....	132
1.1.3- Amplification cellulaire	132
1.1.4- Comptage cellulaire	132
1.1.5- Mise en culture des cellules sur la matrice phosphocalcique	132
1.1.6- Evaluation de la viabilité cellulaire (test MTS) :	133
1.1.7- Analyse statistique :	133
1.2- Résultats :	134
1.2.1- Paramètres de porosité :	134
1.2.2- Etude de la viabilité cellulaire en présence d'A4 (étalon MBCP®).....	134
2- identification des mécanismes de toxicité cellulaires de A4	137
2.1- Matériels et méthodes :	137
2.1.1- Matériels :	137
2.1.2- Méthodes :	137
2.1.2.1- Mesure du pH :	137
2.1.2.2- Mesure des concentration en calcium et en phosphate du milieu de culture :	137
2.1.2.3- Test de viabilité cellulaire en contact indirect avec plaques 24 puits disposant du dispositif « Transwell® ».....	138
2.2- Résultats	138
2.2.1- Mesures du pH du milieu de culture	138
2.2.2- Mesure des concentrations en ion calcium et phosphate du milieu de culture:	139
2.2.3- Culture des cellules adhérentes en puits dotés du dispositif Transwell® :	142
3- Intérêt du frittage à 1200°C sur l'amélioration de la cytocompatibilité des granules de A4.....	144
3.1- Matériels et méthodes:	145
3.1.1- Matériels	145
3.1.2- Méthodologie :	145
3.2- Résultats - Discussion	145

3.2.1- Caractéristiques des granules frittés à 1200°C.....	145
3.2.2- Mesures du pH du milieu de culture	148
3.2.3- Modification des concentrations du milieu de culture en ions calcium et phosphate :.....	149
3.2.4- Test de viabilité cellulaire MTS au contact des granules.....	151
3.2.5- Etude du mode de toxicité cellulaire :	152
3.3- Conclusion	154
Bibliographie	158
Annexes.....	171
Annexe 1	172
Modélisation du phénomène de diffusion en milieu poreux : 2 ^{ème} loi de Fick	172
Annexe 2	175
Dosage des iodures par méthode colorimétrique.....	175
Annexe 3	178
Inclusion dans le Glyco Méthyl MéthAcrylate (GMMA).....	178
Annexe 4.....	180
Rapport d'analyse de porosimétrie à mercure :.....	180
Exemple du BCP Bicalphos	180
Annexe 5	181
Fractionnement de la courbe d'intrusion de mercure	181
Annexe 6	183
Courbes de diffusion des ions iodures	183
Paramètres de diffusion et calcul de la tortuosité	183
Annexe 7	187
Paramètres de porosité et d'interconnexion fournis par porosimétrie à mercure et. par le logiciel Pore Cor®	187
Annexe 8 : protocole de dosage MTS	191

Introduction

Les Céramiques Phosphocalciques Biphassées (BCP pour Biphasic Calcium Phosphate) macroporeuses sont des substituts osseux dotés de propriétés remarquables justifiant leur emploi en médecine humaine dès le milieu des années 1980. Plusieurs critères guident le chirurgien lors du choix du BCP au premier rang desquels la résistance mécanique initiale et la porosité qui conditionnent partiellement les propriétés biologiques de l'implant (*ostéoconduction*).

L'impact de l'architecture poreuse sur le comportement de la céramique *in vitro* et *in vivo* est encore mal connu à l'heure actuelle. La complexité et la multiplicité des microstructures poreuses, l'absence de méthodologie d'étude consensuelle et « universelle » et la difficulté à maîtriser l'architecture poreuse lors de la fabrication en sont les principales raisons.

La complexité de la structure poreuse est le reflet de l'hétérogénéité des pores et de leur répartition au sein de la céramique. La structure poreuse des BCP comprend en effet des pores de dimensions très hétérogènes (leur diamètre varie de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de micromètres), en formes (ronde, allongée, en « bouteille à encre »,...). Par ailleurs, les pores peuvent être reliés les uns aux autres sous la forme d'un réseau interconnecté. Cette « *interconnexion* » ou « porosité interconnectée » est en passe de s'imposer comme un véritable « critère de qualité » supposé influencer les propriétés mécaniques et biologiques de la céramique.

Les paramètres indispensables à cette caractérisation sont la porosité totale qui est un rapport du volume « vide » sur le volume du matériau, le diamètre des pores, la proportion relative de chaque classe de pores, et l'interconnexion.

Les méthodes permettant d'apprécier ces paramètres sont accessibles par l'utilisation de la loi de Darcy relative à l'écoulement d'un fluide dans un milieu poreux sous l'effet d'un gradient de pression, par la mesure de la capacité de transfert par diffusion offerte par un réseau interconnecté, par l'imagerie en microscopie électronique, par la porosimétrie à mercure qui

mesure les principaux paramètres de porosité et permet d'accéder aux paramètres d'interconnexion à leur modélisation tridimensionnelle.

L'objectif de ce travail est de procéder à l'étude de l'architecture poreuse interconnectée des céramiques phosphocalciques biphasées et de mieux définir les conditions de fabrication et de formulation permettant d'apporter la maîtrise de ce paramètre conditionnant les propriétés physiques et biologiques du biomatériau.

Après une première partie consacrée à la présentation du tissu osseux et des substituts osseux, la seconde partie de ce manuscrit évaluera les performances et le caractère « discriminant » de ces méthodes d'étude de la porosité interconnectée sur plusieurs céramiques actuellement commercialisées sur le marché français.

Les troisième et quatrième parties viseront à l'optimisation de l'architecture poreuse interconnectée par le biais du choix d'une formulation adaptée. Classiquement, l'obtention de la porosité pour les BCP se fait par adjonction d'un porogène à la poudre de phosphate de calcium qui est ensuite éliminé grâce à un traitement thermique adapté. La méthodologie retenue a consisté à choisir

- les porogènes les mieux adaptés,
- la quantité idéale de porogènes,
- les proportions respectives dans le cas d'une association entre 2 porogènes.

Enfin, la céramique présentant l'interconnexion la plus performante fera l'objet d'une étude de cytocompatibilité dans une cinquième et dernière partie.

Partie 1 : Tissus et substituts osseux : généralités

1- Définitions, propriétés

L'Organisation Mondiale de la Santé a évalué à plusieurs centaines de millions le nombre de personnes souffrant d'affections ostéo-articulaires dans le monde, et leur nombre devrait doubler d'ici à 15 ans (151). Le remplacement de pertes tissulaires ou d'organes défaillants occupe une place croissante en thérapeutique grâce notamment aux progrès de la médecine qui ont permis de mieux connaître la biologie de ces tissus. Parmi les traitements développés, une avancée significative a été constatée lors de la réalisation de comblements osseux pour remplacer ou restaurer la fonction des tissus ostéo-articulaires ayant subi un traumatisme ou une dégénérescence. Un des objectifs poursuivis par les chercheurs est l'élaboration de substituts osseux qui présentent des propriétés se rapprochant de celles de l'os autologue qui reste la référence en raison de ses propriétés ostéogéniques et de ses performances inégalées à l'heure actuelle (80% des comblements font appel à une greffe osseuse). Cependant, certains inconvénients limitent son utilisation, ce qui a contribué au développement de nouvelles techniques. Les alternatives envisagées ont été dans un premier temps les allogreffes et les puis les biomatériaux de substitution osseuse (150).

1.1- Le tissu osseux

L'os est le composant majeur de notre appareil squelettique et représente environ 20% de la masse corporelle. Il s'agit d'un matériau composite constitué par une fraction organique et une fraction minérale, ce qui lui confère des propriétés de rigidité et de solidité tout en gardant un certain degré d'élasticité. En plus de son rôle dans l'hématopoïèse et son rôle de soutien et de protection, l'os constitue une réserve variable en calcium et en ions inorganiques. Durant la vie, le tissu osseux passe par des phases dynamiques de formation et de résorption afin de s'adapter aux contraintes mécaniques et de maintenir l'homéostasie minérale. Ces processus de remodelage essentiels pour accomplir les fonctions mécaniques et métaboliques du tissu osseux, font intervenir principalement deux types de cellules osseuses : les ostéoclastes et les ostéoblastes. De nombreuses affections peuvent toucher le tissu osseux et on évalue à 150 millions dans le monde le nombre de patients souffrant d'ostéoporose, d'arthrose, de rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthropathies,...). La

prévalence de ces pathologies est donc élevée et on évalue à 12% le nombre de personnes ayant eu au cours de leur vie une affection ostéoarticulaire (38), (67), (141).

1.1.1- Structure du tissu osseux

1.1.1.1- Texture :

L'os peut se présenter sous deux formes : l'os lamellaire dans lequel les fibres de collagène sont orientées au sein de lamelles et l'os « tissé » ou « woven bone » tissu osseux fibreux qui est un os immature non lamellaire caractérisé par la disposition anarchique des fibres de collagène. L'os tissé se trouve dans le squelette de l'embryon humain et en pathologie dans l'os des cals et la maladie de Paget, alors que l'os lamellaire constitue le tissu osseux adulte. Cette texture lamellaire est visible en lumière polarisée sur les coupes examinées au microscope où les lamelles apparaissent alternativement brillantes et sombres du fait de l'orientation différente des fibres de collagène dans deux lamelles contiguës (158).

1.1.1.2- Architecture :

Os compact :

Ce type d'os également appelé os cortical Haversien représente 80% de la masse du squelette. Il est constitué de colonnes parallèles qui, dans les os longs, sont orientées selon le grand axe. Chaque colonne est constituée de lamelles disposées autour de canaux centraux contenant les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs. Les canaux neuro-vasculaires ou canaux de Havers constituent avec leurs lamelles osseuses concentriques le système Haversien. Les paquets neuro-vasculaires s'anastomosent entre eux ainsi qu'avec l'endoste et le périoste par les canaux de Volkman.

Os trabéculaire :

L'os trabéculaire est constitué de travées osseuses anastomosées entre elles et constituant un réseau tridimensionnel continu dans la moelle osseuse. Il ne contient pas habituellement de

système Haversien et les échanges métaboliques se font par l'intermédiaire des canalicules avec les sinusoides sanguins de la moelle osseuse.

1.1.2- Les cellules osseuses

1.1.2.1- Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules chargées de la résorption du tissu osseux calcifié (34). Ce sont des cellules multinucléées de 20 à 100 μm de diamètre. Les ostéoclastes naissent de la fusion de cellules précurseurs mononucléées de la moelle osseuse ou d'autres organes hématopoïétiques. Les noyaux se concentrent près de la surface externe de la cellule alors que les mitochondries se réunissent près de la zone de résorption. Les ostéoclastes entrent en contact avec la matrice osseuse minéralisée à travers deux zones spécialisées de la surface cellulaire : la zone claire (pauvre en organites) et la bordure en brosse. La zone claire épouse la forme de la surface osseuse et est responsable de l'adhérence de l'ostéoclaste à la paroi osseuse. La bordure en brosse possède des pompes spécifiques permettant de libérer les protons vers la chambre de résorption. Cette acidification extracellulaire entraîne d'une part une solubilisation de la phase minérale et d'autre part l'activation d'enzymes lysosomiales qui dégradent la matrice organique.

1.1.2.2- Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules chargées d'une part de la synthèse de la matrice osseuse (collagène type I et protéines non collagéniques) et d'autre part de sa calcification . Ce sont des cellules mononucléées de 20 à 30 μm de diamètre qui ne sont observées que dans les zones d'apposition et de minéralisation osseuse.

1.1.2.3- Les ostéocytes

Les ostéocytes se trouvent au sein de la matrice osseuse dans des logettes appelées lacunes ostéocytaires. Ils proviennent d'ostéoblastes emmurés dans la matrice calcifiée. Les

ostéocytes possèdent plusieurs fonctions qui sont indispensables au maintien d'un tissu osseux bien qu'elles ne soient pas encore bien élucidées.

1.1.3- La matrice extra cellulaire

Englobant les ostéocytes elle est faite d'un trame protéique sur laquelle se fixent les constituants minéraux. Cette double constitution permet de considérer l'os comme un composite naturel dont ses propriétés finales dépendront non seulement de la quantité et des propriétés de chaque constituant mais aussi des interfaces entre les deux fractions. La matrice extracellulaire représente 25% de la masse de l'os.

1.1.3.1- La trame protéique :

Elle est constituée pour l'essentiel de fibres de collagène de type I qui représentent 90% de la trame organique de l'os sec dégraissé. Ces fibres sont séparées par une substance fondamentale peu abondante faite de protéines non collagéniques de l'os baignant dans une solution aqueuse.

1.1.3.2- Fibres de collagène

Chaque fibre de collagène, de type I essentiellement, est faite de faisceaux de fibres ayant toutes la même direction dans une même lamelle mais une direction différente dans deux lamelles contiguës. Chaque fibre primitive est constituée d'un faisceau de fibrilles à structure périodique de 50 à 70 μm d'épaisseur avec alternance régulière de bandes transversales de largeur et d'opacité différentes.

1.1.3.3- Substance fondamentale inter fibrillaire :

La substance fondamentale inter fibrillaire ne représente que 10% de la masse de la trame organique. Elle remplit les intervalles situés entre les fibres de collagène et concourt à leur cohésion. Elle contient de nombreuses protéines non collagéniques possédant des groupements négatifs, ce qui leur permet de se lier aux ions Ca^{2+} de la phase minérale :

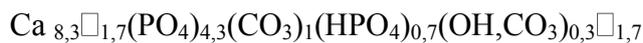
- les protéoglycanes

- les glycoprotéines : protéines spécifiques, collagénase
- facteurs de croissance, protéolipides

1.1.4- Phase minérale :

1.1.4.1- Composition :

La phase minérale de l'os est constituée principalement de calcium et de phosphate. D'autres composants en plus faibles proportions sont aussi présents : des ions hydrogénophosphates (HPO_4^{2-}), des ions carbonates (CO_3^{2-}), ainsi que des ions Magnésium (Mg^{2+}) et sodium (Na^+). A l'état de traces on trouve aussi du chlore, du fluor, du soufre, du zinc,... Si l'on considère uniquement les éléments majeurs, la phase minérale de l'os peut être représentée par la formule suivante (137) :



\square : lacune

Cette composition explique le choix de l'hydroxyapatite (HA) dont la formule est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ comme substitut osseux car la principale différence avec cette dernière est la substitution du phosphate par des ions carbonates et hydrogénophosphate.

1.1.4.2- Structure

La structure de la phase cristalline est celle d'une apatite. Cependant la présence de phases transitoires, précurseurs de la structure apatitique (phosphate octocalcique et brushite) a également été évoquée dans plusieurs travaux (55), (137), (142), Les apatites biologiques ont pour caractéristique principale leur faible cristallinité due à la petite taille des cristallites (156).

1.2- Remodelage osseux :

Le remodelage osseux est le processus physiologique qui permet le renouvellement de la matrice osseuse. Il fait intervenir les ostéoclastes et les ostéoblastes. Le déroulement de cette séquence est le suivant (108) :

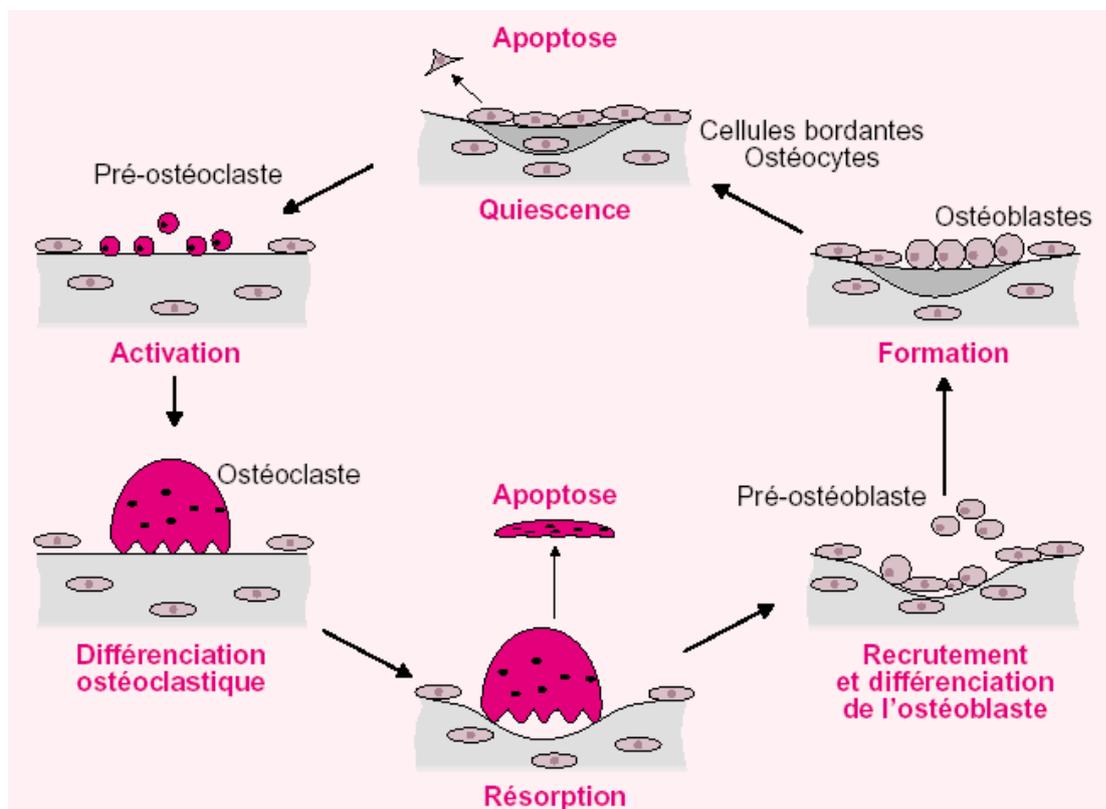


Figure 1 : schéma du cycle de remodelage osseux selon Marie (108)

Tout d'abord, le long de la surface osseuse inactive, recouverte de cellules bordantes ou ostéoblastes quiescents, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes. Cette phase d'activation est suivie de la phase de résorption lorsque les ostéoclastes résorbent l'os ancien. Lorsque les ostéoclastes ont fini leur travail de résorption et creusé une lacune, ils sont remplacés par des cellules mononucléées, précurseurs ostéoblastiques ; c'est la phase d'inversion qui précède la phase de reconstruction. Les ostéoblastes fixés sur cette surface avivée comblent la lacune en apposant une nouvelle matrice osseuse.

Le bon déroulement du phénomène de remodelage nécessite des interactions entre les deux types de cellules, ostéoblastes et ostéoclastes, mais aussi entre les cellules osseuses et la moelle hématopoïétique d'où émergent leurs précurseurs, et entre les cellules osseuses et la matrice osseuse synthétisée par les ostéoblastes. Le remodelage permet une restitution intégrale et un maintien de la structure osseuse.

1.3- Cicatrisation osseuse

La cicatrisation d'une fracture comprend 5 phases. Durant la phase initiale, un hématome se forme et des messagers moléculaires envahissent le compartiment extracellulaire. Ces facteurs suivent la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ensuite, au cours de la phase d'inflammation, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages envahissent le site pour retirer les débris et micro organismes. Ils expriment également des médiateurs biochimiques qui modifient les réponses angiogéniques et fibroblastiques. Cette phase inflammatoire est essentielle pour la cicatrisation osseuse. Après un délai variable en fonction du site, un cal mou se forme reliant les extrémités osseuses. Le cal mou est très riche en cellules et présente les caractéristiques de la matrice extracellulaire avec beaucoup de collagène. Des chondrocytes et des cellules ostéoprogénitrices apparaissent. Cette phase est caractérisée par la formation d'un tissu cartilagineux et la revascularisation. Ensuite les ostéoblastes se différencient et élaborent le tissu ostéoïde. Le cartilage se minéralise et de l'os nouveau apparaît pour former le cal dur. Le remodelage de cet os tissé en os lamellaire se produit en quelques mois si les contraintes mécaniques sont suffisantes (81).

2- Les greffes osseuses

2.1- Autogreffe :

L'autogreffe est le matériau de choix pour la reconstruction des pertes de substance osseuse en raison de son ostéogénicité et de l'absence de réponse immunitaire (51), (91). L'autogreffe corticale est généralement utilisée pour reconstruire des sites soumis à des charges et adapter la greffe à l'anatomie du site receveur. Elle nécessite une immobilisation pour faciliter la

revascularisation et minimiser la résorption. (25), (154). L'autogreffe spongieuse quant à elle fournit des cellules ostéogéniques vivantes et est rapidement revascularisée (115), (153). Les travaux de Deloy (53) ont montré qu'une autogreffe corticale donnait le meilleur score d'union par rapport à une allogreffe fraîche ou congelée ou une allogreffe partiellement déminéralisée. La reconstruction de l'intégralité de la masse de l'architecture osseuse trabéculaire à la suite d'une autogreffe spongieuse en site épiphysaire fémoral chez le lapin a été mise en évidence par les travaux de Chappard (33).

Par leurs propriétés biologiques, les autogreffes sont employées dans un peu moins de la moitié des applications cliniques nécessitant le comblement d'un défaut osseux : chirurgie traumatique, orthopédique, maxillofaciale, craniofaciale, dentaire, rachidienne et tumorale (18), (117), (138).

Malgré ces résultats, l'utilisation des autogreffes n'est pas sans inconvénients (16), (22), (140) : la quantité d'os est limitée et le prélèvement nécessite un deuxième site opératoire (généralement au niveau de la crête iliaque, des côtes, du péroné) ce qui augmente la durée de l'intervention chirurgicale, les pertes sanguines et le risque infectieux. La persistance d'une douleur au site de prélèvement et les risques d'une hernie iliaque, de lésions nerveuses et artérielles sont également des complications qui ont poussé à la recherche de solutions alternatives

2.2- Allogreffes

Les allogreffes proviennent d'os de cadavres de même espèce. Elles sont les plus souvent employées quand une autogreffe n'est pas envisageable à cause de son volume limité (6) et représentent de 25% à plus de 40 % des applications cliniques (28). Les allogreffes sont préparées et stockées dans des banques d'os et son développement a nécessité la maîtrise des conditions de conservation des tissus osseux (26), (64), (144). L'avantage d'une allogreffe est d'être immédiatement disponible et de ne pas faire appel au patient pour être son propre donneur (diminution de la morbidité, des pertes sanguines,...). Par contre l'implantation d'une allogreffe fraîche conduit à une réaction inflammatoire et très souvent au rejet du greffon. Pour diminuer cette immunogénicité, l'allogreffe doit être congelée ou lyophilisée. La congélation semble ne pas affecter les caractéristiques mécaniques du greffon alors que la

lyophilisation diminue ces mêmes propriétés en partie du fait de l'apparition de micro fissures au cours de la réhydratation. Actuellement le frein majeur au développement des allogreffes est le risque de transmission d'agent pathogène (26) mais le problème d'une résorption rapide en parallèle d'une consolidation lente engendrant le risque de fractures secondaires est aussi souvent évoqué (54).

2.3- Xénogreffe

Les xénogreffes sont obtenues à partir d'espèces différentes de celle du receveur. Elles doivent subir un traitement de déprotéinisation et de dégraissage pour diminuer la réponse antigénique ce qui élimine en même temps les propriétés ostéoinductrices. Le processus par lequel les xénogreffes sont remplacées par de l'os est l'ostéoconduction., identique à celui des biomatériaux. Un paramètre qui semble déterminant pour optimiser l'ostéoconduction est la mouillabilité : plus le matériau est dégraissé, plus sa mouillabilité est importante et plus il est envahi rapidement par les fluides extracellulaires et les vaisseaux sanguins (32). Les inconvénients sont liés à la nature hétérologue du greffon et les traitements nécessaires font que les xénogreffes sont relativement peu utilisées (9), (118), (143).

3- Cahier des charges des substituts osseux

De nombreux matériaux issus de formulations très diverses ont été proposés pour répondre au cahier des charges très exigeant des substituts osseux : le substitut osseux idéal est un biomatériau ayant des propriétés mécaniques proches de l'os, pouvant être à la fois sûr et efficace.

La sécurité d'un biomatériau est indissociable de sa *biocompatibilité*. La *biocompatibilité* a été définie comme la capacité d'un matériau à provoquer une réponse appropriée de l'organisme hôte dans une application spécifique (1987). Si cette définition reste d'actualité, elle se heurte à l'absence de tests spécifiques pour l'évaluer. Cette limite a conduit à l'élaboration de la norme NF EN ISO 30993-1 en 1994 applicable à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux (124). Celle-ci propose une série de tests à appliquer aux dispositifs médicaux et non uniquement aux matériaux en fonction de la durée de contact dans l'organisme et du tissu en contact.

Une autre propriété des céramiques phosphocalciques est leur bioactivité c'est à dire leur capacité à se lier avec les tissus osseux sans interposition fibreuse (87). A la suite d'échanges physico-chimiques, une liaison très forte s'établit entre l'implant et l'os receveur. Cette liaison se manifeste par l'impossibilité de retirer l'implant sans casser soit la céramique, soit l'os : la fracture se produit rarement à l'interface (82), (119). Cette liaison très forte se produit mais la composition de l'interface varie selon la nature de l'implant.

Il est admis que tous les phosphates de calcium, même l'hydroxyapatite sont résorbables mais à des degrés divers selon leurs caractéristiques chimiques et physico-chimiques. Au contact des fluides biologiques, tous les phosphates de calcium subissent une biodégradation/biorésorption qui se traduit par des changements de propriétés chimiques du matériau (désintégration, changement de porosité, dissolution, formation de nouvelles phases, transformation de phases). Les facteurs qui influencent cette dégradation sont de deux types : (99) :

-les caractéristiques physico-chimiques du matériau : composition, microporosité, mode de fabrication

-facteurs biologiques : degré de contact osseux, type d'os , espèce animale, age, sexe ...

Les mécanismes conduisant à cette biodégradation/biorésorption sont la combinaison de trois processus :

- Physique : abrasion, fracture, désintégration

- Chimique : dissolution, augmentation locale des concentrations en ions calcium et phosphate conduisant à la formation de nouvelles phases

- Biologique : réduction du pH à la suite des activités cellulaires, ce qui augmente la biodégradation du phosphate de calcium.

La dégradation de la matrice phosphocalcique peut être de deux types : intra ou extracellulaire (87). La dégradation intracellulaire correspond à la phagocytose des particules (152), (161)

alors que la dégradation extracellulaire est un processus de dissolution qui peut se produire en présence ou non de cellules. Après implantation les fluides biologiques initient une dissolution du matériau suivi de la précipitation d'une couche d'apatite carbonatée à sa surface. La continuité ainsi obtenue entre l'os et l'implant favorise la colonisation cellulaire et la formation du tissu osseux. La résorption et la dégradation du substitut osseux sont conduites respectivement par des cellules ostéoclastiques et macrophagiques (5), (7), (49), (50), (79).

Le processus de dégradation des céramiques phosphocalciques biphasées commence par une dissolution extracellulaire de la surface du matériau qui libère des particules de céramique. Ces agrégats sont ensuite incorporés dans le cytoplasme des cellules phagocytaires et dissous par attaque acide ou par processus enzymatique (5). Dans l'idéal, la cinétique de résorption de l'implant est similaire à la vitesse de formation osseuse pour assurer la stabilité de l'implant (56), (161).

Le résultat de la biodégradation de la céramique est une augmentation locale de la concentration en ions calcium et phosphate. Suite à cette élévation, une précipitation de microcristaux d'apatite biologique incorporant des ions présents dans le fluide (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , ...) a lieu en surface et entre les grains de céramiques (44), (45). Elle s'effectue dans un milieu riche en protéines et aboutit à la formation de cristaux aciculaires d'apatite biologique semblables à ceux de l'os.

Cette précipitation est un phénomène purement physico-chimique d'équilibre avec les fluides biologiques (79). Ensuite seulement, lorsque le matériau est en contact avec le tissu osseux, une véritable ostéogénèse se produit autour et dans les macropores de l'implant. De l'os, caractérisé par des ostéocytes et une matrice minéralisée, apparaît au sein du biomatériau. Un remodelage Haversien peut avoir lieu et un turn-over résorption/apposition peut se produire.

La *biocompatibilité* qui est très dépendante de la composition d'un dispositif médical ne doit pas occulter sa *biofonctionnalité*, capacité à répondre aux objectifs assignés, qui est l'autre propriété essentielle qu'il doit respecter. Celle-ci dépend à la fois de la composition et de la conception du dispositif. La *biofonctionnalité* n'est pas codifiée par la norme NF EN ISO 10993-1.

L'ostéoconduction a été définie comme la propriété d'un matériau à recevoir la repousse osseuse par invasion cellulaire, vasculaire et tissulaire à partir du tissu osseux sain au contact du biomatériau et est un paramètre indissociable de la porosité du matériau (4), (50), (66).

3.1- Indications cliniques des substituts osseux

D'une manière générale, les substituts osseux sont utilisés pour le traitement de toutes les pertes de substance cavitaire dans de nombreux types de chirurgies (orthopédique, maxillofaciale, odontologique...). Une revue de la littérature permet de distinguer de nombreuses indications dont une liste non exhaustive est présentée ci-après :

L'utilisation des substituts osseux peut ainsi être envisagée notamment,

- Dans les arthrodèses cervicales et vertébrales (106), (129),
- Lors des pertes de substance cavitaires liées à un traumatisme (37), à une pose de prothèse (129) ou à une exérèse cancéreuse (27),
- En chirurgie orale et maxillo-faciale (57), (42)
- Dans les ostéotomies d'ouverture,
- Dans les comblements divers : sinus, os (37).

3.2- Principaux matériaux de substitution osseuse

Les matériaux de substitution qui sont présentés sont classés selon leur origine biologique ou synthétique.

3.2.1- Matériaux d'origine biologique

3.2.1.1- Substituts osseux d'origine bovine.

Les implants osseux d'origine bovine sont préparés à partir des zones épiphysométaphysaires de fémurs et humérus de bœufs. Les animaux sont issus de régions de pays exempts de tout cas d'encéphalopathie spongiforme des bovins (116).

La matière première subit un traitement de dégraissage suivi d'une étape de déprotéinisation (disparition de l'antigénicité). Certains produits (BIOSEM II®, ENDOBON®) sont ensuite débarrassés de leur collagène et portés à très haute température. Lors de cette étape de céramisation, l'os subit une transformation chimique en hydroxyapatite.

L'avantage des substituts osseux d'origine bovine est qu'ils possèdent une porosité interconnectée très similaire à celle de l'os trabéculaire avec une taille des pores de 100 à 2000 microns et une porosité de l'ordre de 60 à 70 %. Les propriétés mécaniques sont généralement en retrait par rapport à celles de l'os avec une résistance en compression de 5 Méga Pascals (MPa) pour le PYROST® et 10-15 MPa pour l'ENDOBON® (116).

Une des inquiétudes des praticiens concerne la sécurité d'utilisation de ces produits du fait de la possible transmission à l'homme d'agents pathogènes (virus, agent de encéphalopathie spongiforme bovine). L'amélioration des techniques de purification et les étapes de céramisation où l'implant est porté à très haute température (> 1200 °C) ont sécurisé l'utilisation de ces matériaux.

3.2.1.2- Substituts osseux d'origine corallienne

La matrice minérale du corail est formée d'un exosquelette de polypes (invertébrés marins) résultant d'une cristallisation. Certains coraux ont une structure poreuse régulière assez proche de l'os spongieux (*Porites, Goniopora, Acropora*), d'autres possèdent une paroi externe compacte rappelant l'os cortical (*Favites, Lobophyllia*) (116).

Plusieurs biomatériaux d'origine corallienne sont actuellement proposés au clinicien. Parmi les plus utilisés, on trouve l'INTERPORE 200® et le BIOCORAL® qui font appel à différentes espèces sélectionnées en fonction de leur architecture poreuse et des indications cliniques.

Un traitement hydrothermal permet la transformation du corail (carbonate de calcium) en hydroxyapatite (> 90 %) et sulfate tricalcique magnésique. Le BIOCORAL® est fabriqué à partir de coraux récoltés vivant, lavés, séchés puis à nouveau lavés par immersion dans un bain d'hypochlorite de sodium et enfin rincés pendant 24 heures. Le BIOCORAL® est composé uniquement de carbonate de calcium.

Les substituts osseux coralliens possèdent une structure poreuse interconnectée remarquable combinant une porosité variable (20 à 65 %) formée de pores jusqu'à 600 µm de diamètre et dotée d'un fort degré d'interconnexion.

3.2.2- Ciments ioniques, hydrauliques et acryliques :

3.2.2.1- Les ciments ioniques ou hydrauliques

Ces ciments de nature phosphocalcique se présentent sous la forme de poudres qui prennent une consistance pâteuse après mise en suspension (36). Le phénomène de cristallisation va entraîner un durcissement de la préparation. La formation de cristaux peut résulter d'une réaction acide base entre un sel d'acide phosphorique et un sel basique ou de l'hydrolyse d'un composé (phosphate tricalcique alpha par exemple). La réaction est obtenue à température et pression ordinaire en quelques minutes. Ces ciments ont l'avantage de part leur nature pâteuse et de leur possibilité d'injection de remplir et de combler parfaitement les pertes de substance osseuse (36), (58), (84), (90), (114). L'ancrage obtenu est de nature mécanique par pénétration des anfractuosités de l'os. Ces ciments ont en revanche un médiocre comportement mécanique. Des recherches visent donc à optimiser les propriétés de ces matériaux mais aussi de développer de nouveaux produits qui permettraient la formation de pores *in situ*.

3.2.2.2- Les ciments acryliques

Les ciments acryliques sont composés de polymères acryliques et utilisés avant tout pour fixer les implants prothétiques. Le ciment durcit en quelques minutes et offre alors d'excellentes qualités mécaniques. Ces caractéristiques expliquent que ce matériau soit aussi utilisé dans le

comblement de certaines cavités liées à des pathologies tumorales ou des lésions fracturaires lorsqu'on ne veut pas recourir à une autogreffe ou à une allogreffe.

3.2.3- Verres biologiques

Les bioverres sont élaborés par chauffage d'un mélange de poudres SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5 au dessus de son point de fusion, de l'ordre de 1300°C . Le liquide obtenu est refroidi progressivement. Il solidifie ainsi sans cristalliser pour former un matériau amorphe (verre). L'implant en bioverre se lie à l'os par un accrochage chimique à travers une interface apatitique (121). Les bioverres sont extrêmement fragiles et leurs applications sont donc limitées à des pièces non sollicitées mécaniquement ou au dépôt sur des métaux.

3.2.3- Céramiques phosphocalciques

La famille des phosphates de calcium est très vaste et les composés les plus souvent employés en pratique sont :

- le phosphate tricalcique bêta
- l'hydroxyapatite
- les mélanges biphasés d' HA et β - TCP (en proportion variable selon les produits).

3.2.3.1- Hydroxyapatite :

La première hydroxyapatite commercialisée, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, a été développée par Jarcho (87) . Il s'agit de la DURAPATITE®. Plusieurs implants de ce type sont aujourd'hui sur le marché. Ces dispositifs médicaux se présentent sous la forme de blocs ou de cylindres avec une porosité totale variant de 30% à 60%. Ces hydroxyapatites d'origine synthétique sont représentées par la SYNATITE® le CEROS® la CERAPATITE® et OSSATITE®. L'hydroxyapatite est peu soluble et subit une faible dégradation *in vivo* (100). L'Hydroxyapatite est aussi utilisée pour le recouvrement de prothèses métalliques pour promouvoir leur ostéo-intégration (43).

3.2.3.2- Phosphate tricalcique bêta

Le phosphate tricalcique bêta de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a également été développé comme substitut osseux synthétique (19), (61), (81), (162). Ce biomatériau est beaucoup plus soluble que l'hydroxyapatite et sa dégradation est beaucoup plus importante in vivo (99). Cette solubilité de la matrice participe à l'enrichissement local en ions calcium et phosphate avec pour conséquence un effet de recrutement sur les cellules ostéo-progénitrices. Le BIOSORB® et le CALCIRESORB® ont des applications humaines depuis 1992 et 1990 respectivement sous forme de granules ou de blocs. Les porosités sont comprises entre 30 et 45%.

3.2.3.3- Céramiques phosphocalciques biphasées :

Depuis l'apparition de la TRIOSITE® , première céramique phosphocalcique biphasée, composée de 60% d'HA et de 40% de phosphate tricalcique bêta, de nombreuses autres céramiques aux caractéristiques physico-chimiques très hétérogènes ont été mises sur le marché.

3.2.3.3.1- Propriétés chimiques des BCP

Les céramiques phosphocalciques biphasées sont formées à partir de deux phosphates de calcium d'intérêt biologique : l'Hydroxyapatite (HA) et le Phosphate Tricalcique Bêta (β TCP) (69), (104).

Il est apparu naturel dans le milieu des années 1980 d'associer les qualités respectives de chacun de ces composés pour former des céramiques biphasées (47), (48), (49). Les proportions entre l'HA et le β -TCP varient selon le produit de 50 % d'HA (BCP BICALPHOS®) à 75 % d'HA (BIOSEL®).

Les propriétés des BCP obtenus sont ainsi intermédiaires entre l'HA et le β -TCP et également en fonction de la proportion respective entre les deux éléments (40), (133).

3.2.3.3.2- Synthèse des céramiques phosphocalciques biphasées

Une des méthodes classiques de préparation des céramiques phosphocalciques biphasées consiste en l'utilisation des techniques des céramistes (23). Les produits de base sont préparés par synthèse chimique et se présentent sous la forme de poudres. La mise en forme pour l'utilisation clinique nécessite plusieurs opérations. Une des techniques les plus utilisées comprend la calcination (chauffage aux environs de 900 °C) suivie de la compaction et du chauffage de la poudre entre 1100 et 1300 °C. Ce dernier traitement a pour but de consolider et de densifier la pièce compactée. Dans le cas des céramiques phosphocalciques le maintien d'une porosité est nécessaire pour conserver les propriétés de *bioactivité* et d'*ostéoconduction* de l'implant.

3.2.3.3.3- Caractéristiques de porosité des BCP :

La porosité reflète les propriétés de résistance mécanique et d'ostéoconduction du matériau (66). Il existe plusieurs types de porosité :

- La macroporosité (diamètre des pores $> 100 \mu\text{m}$) est un paramètre déterminant pour permettre la colonisation cellulaire et l'obtention d'une résistance mécanique satisfaisante du matériau (17), (160). Elle est créée délibérément afin de favoriser la pénétration des cellules et des tissus vivants. Les cellules utilisent donc l'architecture macroporeuse comme charpente et comme matière première pour l'élaboration d'une matrice organique qui va ensuite se minéraliser. On sait que la taille minimale des pores requise pour observer ce phénomène *d'ostéoconduction* se situe aux environs de 80 à 100 μm de diamètre mais de plus grandes dimensions favorisent dans une certaine mesure la repousse osseuse (72). La porosité est obtenue notamment par addition aux poudres initiales d'eau oxygénée, de billes de naphthalène, de poudre de saccharose qui disparaissent lors des étapes de chauffage libérant des espaces poreux au cœur de la céramique.
- La microporosité (diamètre des pores $< 10 \mu\text{m}$) qui est due en partie aux espaces entre les grains de poudre persistant après le frittage. Le réseau microporeux permet la diffusion au cœur de l'implant des fluides biologiques et des petites molécules

nécessaires au métabolisme cellulaire (ions, nutriments, oxygène). Par ailleurs, ce contact intime entre le BCP et son environnement est à l'origine d'un phénomène de dissolution / précipitation aboutissant à la formation d'une couche de cristaux d'apatite biologique semblables à ceux de l'os avoisinant.

- Les mésopores (diamètre des pores intermédiaires entre 10 et 100 μm) étaient initialement absents des premières céramiques, conséquence « historique » des processus de fabrication qui ne permettaient pas ou peu d'obtenir cette classe de pores. La diversification des modes de fabrication a permis de créer des mésopores au cœur des céramiques phosphocalciques biphasées sans qu'un rôle particulier ne leur ait été attribué.

Cette distinction en macropores, mésopores et micropores reprend dans son principe la nomenclature de l'IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) avec cependant une définition fonction des diamètres des pores propre au secteur des biomatériaux et basée sur les capacités du pore à promouvoir l'ostéoconduction.

3.2.4- Propriétés biologiques des BCP

La biocompatibilité des BCP a été prouvée par de nombreux auteurs : absence de toxicité systémique ou locale, d'inflammation ou de réponse cellulaire à un corps étranger (10), (49), (113).

Une autre des propriétés des céramiques phosphocalciques biphasées est leur *bioactivité* c'est à dire notamment leur capacité à se lier avec les tissus osseux sans interposition fibreuse (87). A la suite d'échanges physico-chimiques, une liaison forte s'établit entre l'implant et l'os receveur. Cette liaison se manifeste par l'impossibilité de retirer l'implant sans casser soit la céramique, soit l'os : la fracture se produit rarement à l'interface (52), (82).

Enfin les BCP sont *ostéoconductrices* en servant de support pour la pénétration cellulaire et de charpente à la repousse osseuse sous réserve de disposer de pores d'un diamètre suffisant ($> 100 \mu\text{m}$).

3.2.5- Interconnexion et porosité interconnectée

Les propriétés biologiques et physico-chimiques des céramiques ne peuvent s'exprimer que si leur architecture est adaptée à une diffusion en profondeur des fluides biologiques ainsi qu'à une colonisation du matériau par les cellules ostéogéniques. **Cette architecture particulière des BCP est constituée par une structure de type macro, méso et microporeuse, comme il a été précisé précédemment.**

Le réseau poreux de la céramique est dit *interconnecté* quand les pores sont reliés les uns aux autres. La communication entre deux pores peut se faire par contact direct entre les trajets poreux qui s'abouchent l'un à l'autre ou par le biais d'un canal d'interconnexion de plus faible calibre reliant les 2 pores principaux (figure 2). C'est cette **connexion simultanée et réciproque de plusieurs pores que l'on appelle l'interconnexion.**

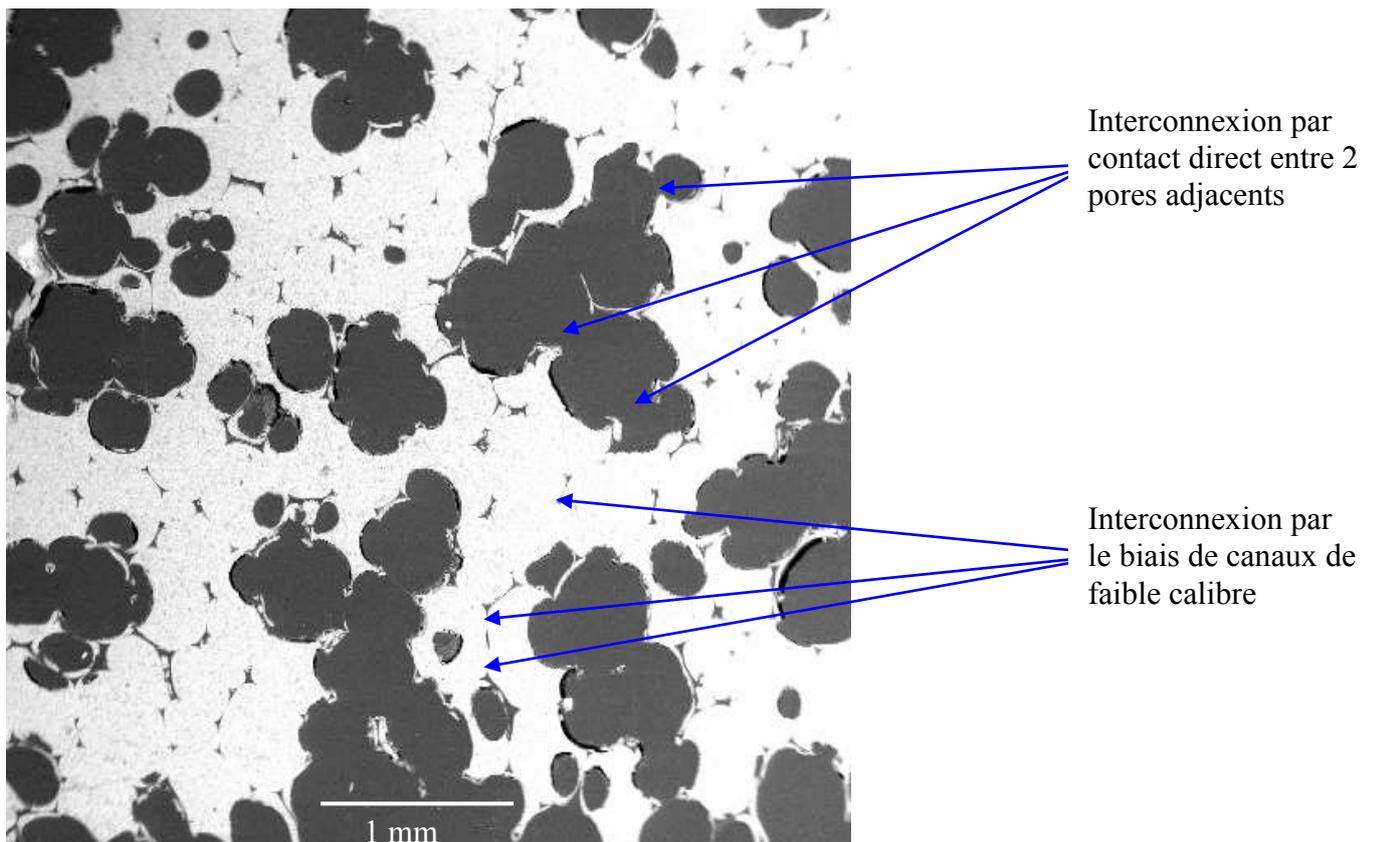


Figure 2 : Exemple de canaux d'interconnexion (BCP Bicalphos®) – Photo prise au Microscope électronique à balayage, grossissement x 20

L'intérêt de disposer d'une céramique dont la porosité est interconnectée a été débattu par plusieurs auteurs (60), (80), (105). Lu *et al* (1999) ont comparé la colonisation cellulaire in

vitro et in vivo d'implants de phosphate tricalcique bêta dont ils ont mesuré les diamètres des canaux d'interconnexion (105). Les résultats suggèrent que l'interconnexion favorise la repousse osseuse au sein de la céramique. Une étude postérieure de la même équipe confirme l'importance d'une « densité d'interconnexion » élevée pour observer la colonisation et la repousse osseuse au cœur d'un implant de Poly méthyl méthacrylate (60).

Par ailleurs, on prête à l'interconnexion un rôle favorable sur la circulation des fluides biologiques au cœur de l'implant et sur les phénomènes de dissolution de la matrice phosphocalcique (établissement d'équilibres ioniques entre la phase minérale et la phase aqueuse) ou sur les capacités d'échanges entre la cellule et son environnement (métabolisme cellulaire).

Propriétés mécaniques

Un des points faibles des céramiques de phosphate de calcium macroporeuses est représenté par leur fragilité et leur résistance mécanique moyenne qui limitent leur utilisation isolée au comblement osseux dans des sites sans contraintes. Dans le cas inverse, elles doivent être associées à différents dispositifs d'ostéosynthèse qui sont alors mis en place pour éviter l'écrasement de la céramique durant toute la période de remplacement de l'implant par l'os néoformé.

Les valeurs de la résistance en compression varient fonction de la céramique considérée de quelques MPa (BCP BICALPHOS®) à quelques dizaines de Mpa (BICERAM®) (143), à comparer aux 40-60 MPA obtenus pour l'os trabéculaire (136) et 100 Mpa et plus pour l'os cortical (39).

Les performances mécaniques de l'implant sont en partie liées à ses caractéristiques physico-chimiques et architecturales (23).

3.2.6- Principales céramiques phosphocalciques biphasées commercialisées

On dénombre une douzaine de céramiques phosphocalciques biphasées sur le marché français disponibles notamment sous la forme de blocs de dimensions variables (depuis 5x5x20mm à 10x10x40mm), de granules de (1.6 à 3 mm de diamètre) ou de formes géométriques variables. Le tableau 1 présente une liste des principaux produits commercialisés.

Nom commercial	Fabricant	Distributeur	Composition chimique	Forme du substitut osseux
BCP Sofamor®	TEKNIMED®	MEDTRONIC SOFAMOR Danek®	TCP 40 % HA 60 %	Granules et blocs
BCP Bicalphos®	MEDTRONIC SOFAMOR Danek®	MEDTRONIC SOFAMOR Danek®	TCP 35-50 % HA 50-65 %	Granules et blocs
BICERAM®	SBM®	S.E.M. ®	TCP 40 % HA 60 %	Blocs
BIOSEL®	BIOLAND®	DEPUY®	TCP 25 % HA 75 %	Granules
CALCIRESORB35®	CERAVER OSTEAL®	CERAVER OSTEAL®	TCP 35 % HA 65 %	Granules
Céramique Biphasée pour Comblement ®	CERAVER OSTEAL®	CERAVER OSTEAL®	Calciresorb 35 % Cerapatite (HA) 65 %	Blocs
EUROCER 200®	BIOLAND®	FOURNITURES HOSPITALIERES®	TCP 40 % HA 60 %	Blocs
EUROCER 400®	BIOLAND®	FOURNITURES HOSPITALIERES®	TCP 45% HA 55 %	Granules
MBCP®	BIOMATLANTE®	SCIENT'X®	TCP 40 % HA 60 %	Granules et blocs
PHYSIO 6®	SBM®	B BRAUN Aesculap®	TCP 40 % HA 60 %	Granules et blocs
T.C.H. ®	BIOLAND®	DEPUY ®	TCP 25 % HA 75 %	Granules
TRIOSITE®	BIOMATLANTE®	ZIMMER®	TCP 40 % HA 60 %	Granules et blocs

Tableau 1 : tableau récapitulatif des principales céramiques phosphocalciques biphasées présentes sur le marché français en 2003 (98)

3.2.7- Les céramiques injectables :

Les techniques non invasives constituent des approches thérapeutiques nouvelles qui combinées aux progrès de la technologie des biomatériaux phosphocalciques permettent et justifient le développement de substituts osseux injectables. L'idée d'associer des granules de céramiques phosphocalciques biphasées dont les propriétés chimiques et biologiques sont démontrées avec un polymère biocompatible a abouti au développement de l'IBS (Injectable Bone Substitute) dont les études pré-cliniques réalisées chez l'animal ont montré une supériorité de la colonisation osseuse comparée aux céramiques phosphocalciques biphasées macroporeuses (41), (68), (70), (71), (157). Par ailleurs il a été établi que la matrice des granules de phosphates de calcium pourrait servir de support pour la libération contrôlée de principes actifs.

Partie 2 : Développement de techniques d'étude de l'architecture poreuse interconnectée

1– Aspects théoriques et mise au point des techniques d'étude de l'architecture poreuse interconnectée des BCP

L'architecture poreuse (diamètre des pores, porosité totale,...) a été largement étudiée pour l'hydroxyapatite et les céramiques phosphocalciques biphasées. Plusieurs publications définissent des caractéristiques de porosité idéales pour permettre l'ostéoconduction et à terme le remplacement du substitut par de l'os néoformé (19), (21), (29), (72), (89), (101), (110).

Un nombre beaucoup plus restreint d'études traitent de l'interconnexion de la porosité (60), (105). Le plus souvent les auteurs relèvent le caractère interconnecté ou non de la céramique à l'aide de clichés photographiques réalisés par microscopie électronique. La principale méthode de quantification est alors la mesure du diamètre de l'interconnexion supposée. Cette approche « bidimensionnelle » n'est pas satisfaisante pour modéliser un phénomène complexe tridimensionnel. Il apparaît donc indispensable de mettre au point une méthodologie visant à appréhender l'architecture poreuse interconnectée d'un échantillon dans sa globalité.

1.1- Mise au point des techniques d'études de l'interconnexion des BCP

L'interconnexion traduit la connexion simultanée et réciproque de plusieurs circuits et désigne donc la manière dont les pores sont mis en relation, «l' interconnexion» apparaît être un terme «générique» difficilement quantifiable. Le calcul du degré d'interconnexion des trajets poreux doit donc se faire stricto sensu en dénombrant l'ensemble des « carrefours de communication » entre deux pores par unité de volume du solide. C'est le principe des études d'histomorphométrie menées sur l'os trabéculaire où la connectivité de l'échantillon est calculée en comptant le nombre de nœuds, c'est-à-dire d'intersections, du réseau trabéculaire (42). Ces techniques de squelettisation des trajets poreux ne sont pas applicables pour les céramiques en raison de la grande disparité des diamètres des pores qui mesurent de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de microns. Devant l'impossibilité de mesurer

directement l'interconnexion des céramiques phosphocalciques, nous nous sommes penchés sur la signification physique d'un réseau poreux interconnecté.

En dépit des implications prouvées ou supposées de l'interconnexion notamment sur les capacités d'ostéoconduction offertes par les BCP, l'étude de ce paramètre s'est souvent résumée à une évaluation de la taille des canaux d'interconnexion par microscopie électronique (60), (80), (105). Les fabricants de céramiques se limitent le plus souvent à mentionner le caractère interconnecté ou non de leur produit. Cette mauvaise connaissance de l'interconnexion tient donc au fait qu'elle a longtemps été mal identifiée et mesurée.

L'objectif de cette première partie est d'explorer différentes techniques de mesure visant à évaluer le niveau d'interconnexion d'une céramique biphasée et à mieux positionner ce paramètre parmi toutes les caractéristiques de porosité de ce matériau.

1.1.1 – Matériels et méthodes :

1.1.1.1 – Matériels utilisés :

Deux céramiques biphasées synthétisées à l' Unité Inserm UMRS 791 ont été utilisées pour la mise au point des techniques de mesure de l'interconnexion. Ces céramiques appelées JMB4 et JMB5 ont été choisies en raison de leur différence d'aspect morphologique malgré la similitude de leurs processus de fabrication.

Sans rentrer dans le détail de la synthèse de ces biomatériaux qui n'ont pas été conçus initialement pour réaliser une étude de leur architecture poreuse, il semble important de préciser certains de leurs paramètres de synthèse. Ces deux BCP ont été fabriqués à partir de poudre d'HA et de β -TCP selon un rapport de 50%/50% (v/v). Le porogène utilisé a été dans les deux cas du naphthalène de granulométrie 400-500 μ m avec respectivement 45 et 42 % de pourcentage massique de porogène incorporé au mélange des deux poudres. Toutes les autres caractéristiques (temps de mélange des poudres, type de compression, traitement thermique) étaient identiques.

1.1.1.2 – Méthodes d'analyse :

Il est rapidement apparu que l'interconnexion est un paramètre intimement lié à la capacité de transfert de fluides au sein d'un matériau poreux. Cette caractéristique physique est appelée perméabilité et ne possède pas de définition au sens normatif du terme. Le *Dictionnaire Français d'Hydrogéologie* (65) définit ce paramètre comme « l'Aptitude d'un milieu à se laisser traverser par un fluide sous l'effet d'un gradient de potentiel ».

1.1.1.2.1- Mesure de la perméabilité d'un échantillon poreux :

Perméabilité et conductivité hydraulique d'un échantillon poreux :

La perméabilité est une caractéristique physique qui peut être considérée comme significative de la surface utilisable pour l'écoulement et dépend de la géométrie du réseau poreux. Henry Darcy conclut en 1856 à une relation entre le débit du fluide et le gradient de pression qui lui est appliqué grâce à un paramètre caractéristique du milieu poreux traversé : la perméabilité « k ».

La loi de DARCY s'exprime pour un fluide incompressible de la manière suivante :

$$k = \frac{\eta \cdot L \cdot Q}{A \cdot \Delta P} \quad [\text{m}^2] \quad (1)$$

Avec Q [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$] le débit de fluide, A [m^2] la section de la pièce poreuse offerte à l'écoulement, η [$\text{Pa} \cdot \text{s}$] la viscosité dynamique du fluide, L [m] la longueur de la pièce poreuse et ΔP [Pa] la différence de pression de part et d'autre du milieu poreux.

La perméabilité s'exprime en m^2 , néanmoins les géologues et spécialistes de l'industrie minière et pétrolière peuvent aussi utiliser le « Darcy » selon le rapport : 1 Darcy = $0,97 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2$.

Il est possible de s'affranchir des effets liés à l'utilisation d'un fluide par le calcul de la conductivité hydraulique (K) donnée par la relation suivante :

$$K = \frac{k}{\eta} \quad [\text{m.s}^{-1}] \quad (2)$$

avec η la viscosité dynamique du fluide et k la perméabilité de l'échantillon.

Ainsi la perméabilité est une caractéristique du matériau qui peut être contrôlée par la porosité alors que la conductivité hydraulique est caractéristique des conditions d'écoulement dans un matériau donné pour un fluide donné. La conductivité hydraulique prend donc en compte dans une certaine mesure les interactions physiques entre l'échantillon et la roche ou le matériau.

Conditions d'application de la loi de Darcy et nombre de Reynolds :

La perméabilité d'un milieu poreux est définie pour des conditions d'écoulement laminaire dans un milieu homogène et isotrope, le fluide n'interagissant pas avec le milieu.

Le nombre de Reynolds permet de conclure quant-à la nature laminaire ou non de l'écoulement d'un fluide au travers d'une conduite, d'un capillaire ou d'un pore. Le nombre de Reynolds critique (R_e critique) pour un cylindre creux est aux alentours de 2100. Par analogie, un nombre de Reynolds critique global est défini pour un fluide traversant un milieu poreux :

$$R_e = \frac{q.d}{v} \quad (3)$$

où q [m.s⁻¹] est le rapport de Q / A , d [m] est la longueur d'un pore élémentaire et V [m².s⁻¹] la viscosité cinématique du fluide. La longueur d'un pore est difficile à évaluer aussi est-il d'usage de l'approximer par la valeur du diamètre moyen des grains constitutifs de l'échantillon (8)

L'écoulement reste laminaire au sein de l'échantillon poreux tant que le nombre de Reynolds critique reste en deçà d'une valeur comprise entre 1 et 10 (8).

Techniques de mesure de la perméabilité :

- Technique utilisant le fluide « air » :

Différentes méthodes de mesure de la perméabilité ont été testées afin de déterminer le domaine d'application de chaque technique pour l'étude des céramiques phosphocalciques biphasées.

La première technique de mesure utilise l'air comme fluide traversant la céramique et le montage retenu pour en effectuer la mesure s'inspire de la norme NF ISO 4022 relative à la détermination de la perméabilité aux fluides des matériaux frittés métalliques perméables (126). La mesure de la perte de charge d'un gaz par rapport à un liquide présente plusieurs avantages :

- Le gaz est moins chargé en particules qui pourraient s'opposer à l'écoulement du fluide
- Il n'existe pas d'effets capillaires qui pourraient modifier la perméabilité
- Les gaz sont des fluides moins visqueux que les liquides ce qui se traduit par un régime d'écoulement laminaire pour des vitesses élevées même dans les plus petits trajets poreux de la céramique

Pour les solides poreux peu perméables, la perte de charge peut être importante et la technique utilisant l'air comme fluide n'est pas adaptée en raison :

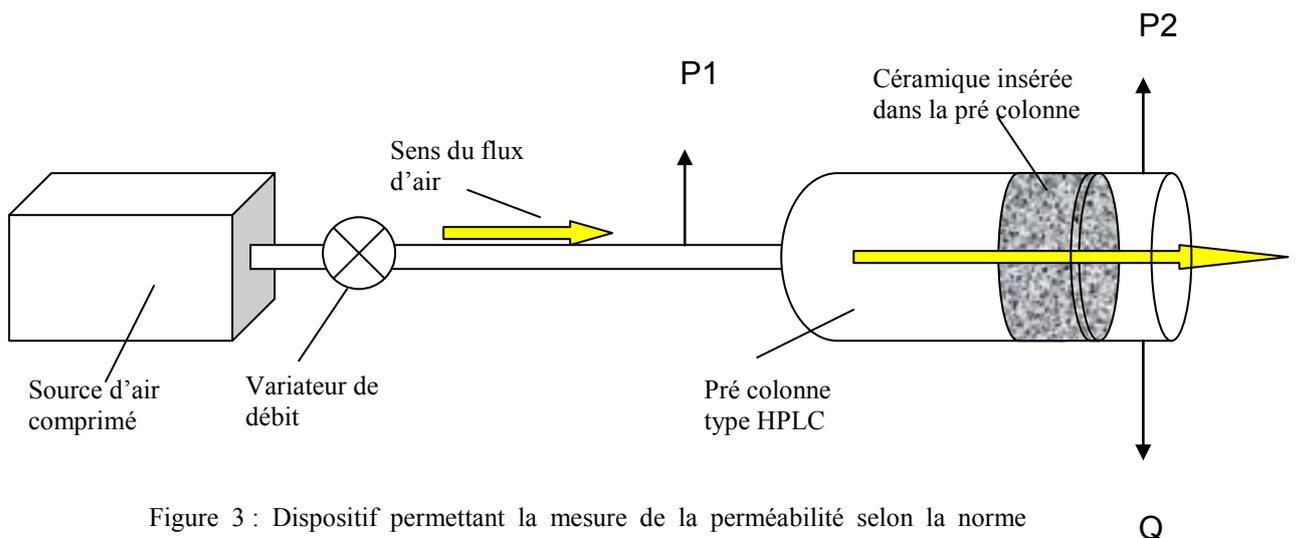
- De l'importante perte de charge, conséquence de la résistance opposée par les trajets poreux à l'écoulement du gaz.

- Des vitesses élevées du gaz atteintes dans les trajets poreux de faible diamètre. La transition s’amorce alors d’un régime d’écoulement laminaire vers un régime d’écoulement turbulent rendant inexploitable la loi de DARCY

Le recours à un fluide liquide est donc requis pour les céramiques de faible perméabilité. Il conviendra au préalable :

- D’éviter la précipitation de gaz dissous sous forme de bulles dans les trajets poreux de faible calibre.
- De minimiser la réaction d’adsorption des liquides sur les parois du pore qui tend à sous estimer sa taille réelle

La norme (126) sur la détermination de la perméabilité aux fluides des matériaux frittés perméables nous a inspiré le montage suivant :



La loi de DARCY n’est valable que pour un fluide incompressible ce qui n’est pas le cas des gaz. On peut néanmoins calculer la perméabilité à un gaz (k_g) à partir de l’équation suivante (104) :

$$k_g = \frac{\eta \cdot P_b Q_b L}{A (P_1 - P_2) \cdot P} \quad (4)$$

Avec η [Pa.s] la viscosité dynamique du gaz, P_b [Pa] la pression atmosphérique, Q_b [$m^3 \cdot s^{-1}$] le débit du fluide, L [m] la longueur de la céramique, A [m^2] l'aire opposée à l'écoulement, et $P = (P_1 - P_2) / 2$ [Pa].

Une pré colonne HPLC est utilisée comme support pour les échantillons de céramiques soumis à la pression de l'air. Les échantillons (6 de chaque céramique) ont été taillés en cylindres de 4,0 à 7.0 mm de longueur X 4,5 mm de diamètre pour pouvoir être introduits dans la pré colonne.

Un pré traitement doit être réalisé : la céramique est placée dans une cuve à ultrasons pendant 2 fois 30 secondes pour éliminer toute obstruction « parasite » des canaux. L'élimination de l'eau a lieu par chauffage à l'étuve pendant 3 jours à 37°C.

Une mesure de la pression en amont et en aval de la pré colonne est effectuée pour chaque valeur de débit. Nous avons travaillé à basse pression ($< 2,5 \cdot 10^5$ Pascals) afin de respecter le régime d'écoulement laminaire de l'air au travers des pores interconnectés.

Les mesures des couples pression / débit d'air sont réalisées à l'aide d'un débitmètre de marque « TIMETER instrument corporation » modèle « RT 200 ».

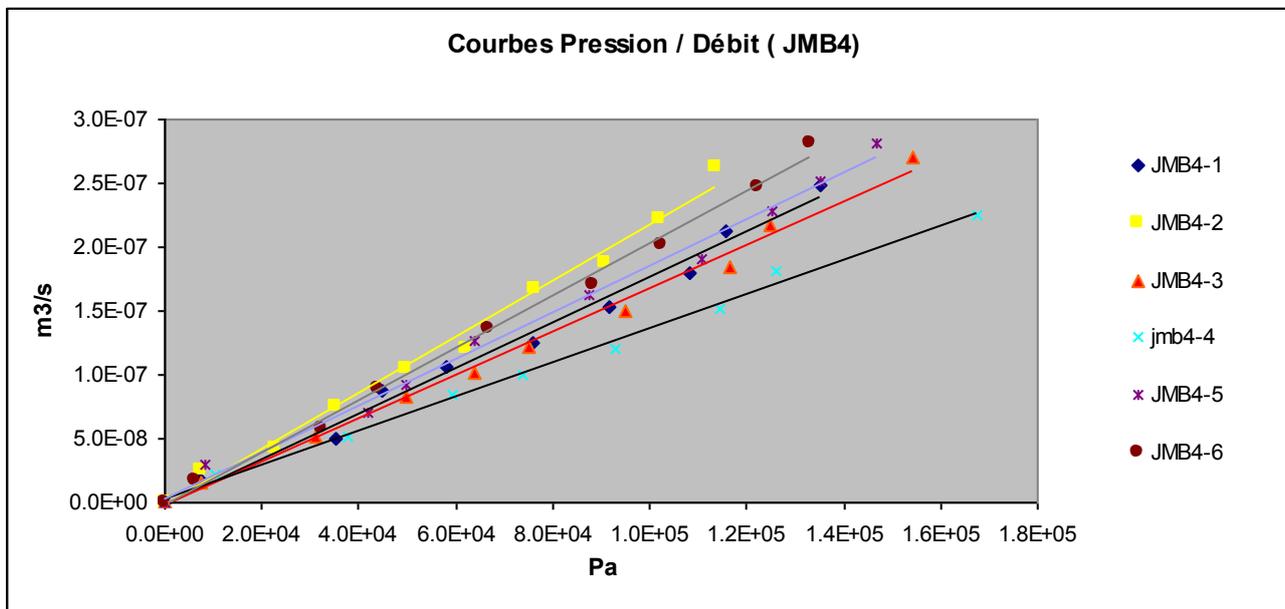
L'appareil utilisé pour déterminer la perméabilité des échantillons de BCP est présenté figure 3.

- Le débit maximal expérimental pour JMB 4 était de $2.82 \cdot 10^{-7} m^3 s^{-1}$ ce qui correspond à un nombre de Reynolds $R_e = 6.1 \cdot 10^{-3}$
- Le débit maximal expérimental pour JMB 5 était de $3.57 \cdot 10^{-7} m^3 s^{-1}$ ce qui correspond à un nombre de Reynolds $R_e = 7.7 \cdot 10^{-3}$

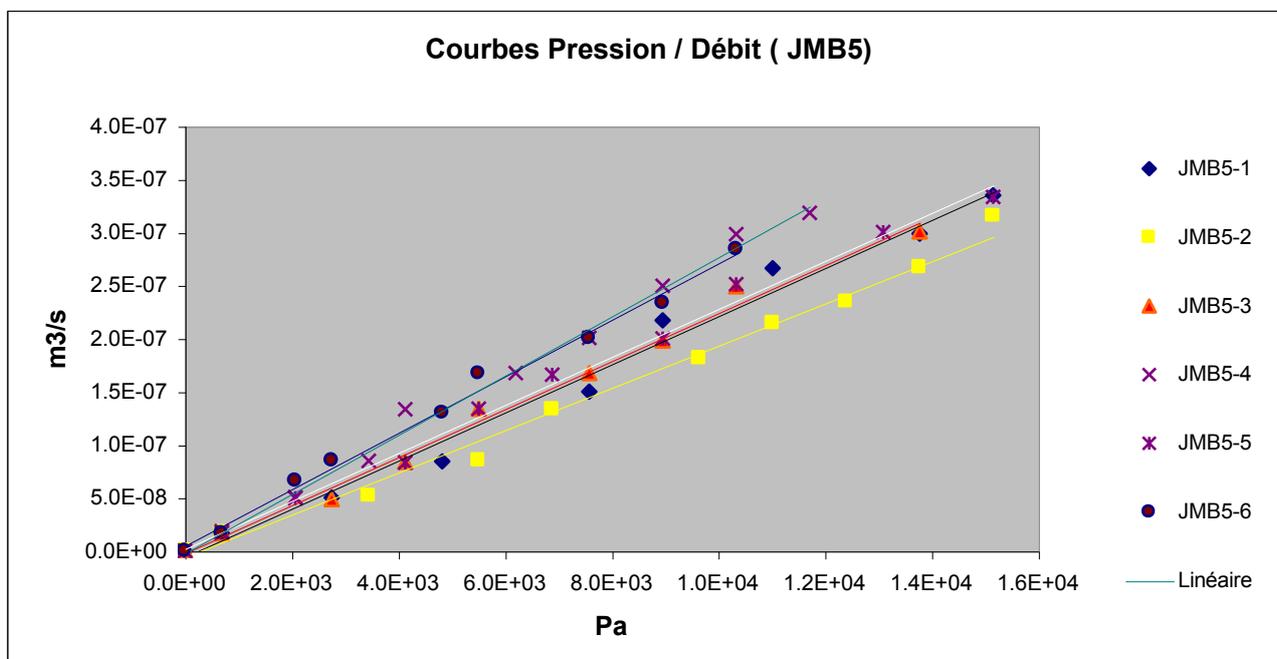
Avec la viscosité cinématique de l'air $= 1.45 \cdot 10^{-5} m^2 s^{-1}$.

Les valeurs du nombre de Reynolds restent inférieures à 0.1 ce qui traduit un écoulement de nature laminaire. Il est donc légitime d'appliquer la loi de Darcy.

Les graphiques 1 et 2 présentent les courbes débit = f (pression) pour les échantillons des céramique JMB 4 et JMB 5 (n=6).



Graphique 1: courbes débit d'air = f (différence de pression) pour JMB 4



Graphique 2: courbes débit d'air = f (différence de pression) pour JMB 5

Les perméabilités sont calculées à partir de la loi de DARCY modifiée pour les fluides compressibles (équation (4)).

La céramique JMB 5 est la plus perméable avec une perméabilité moyenne de $1,06 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2$ contre $8,18 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2$ pour JMB 4.

La comparaison des moyennes des perméabilités de JMB 4 et JMB 5 est basée sur l'application de la loi de Student-Fisher pour les petits échantillons. On observe un $t_{\text{exp}} = 22,3$ à comparer au $t_{\text{lim}} = 3,2$ pour le risque $\alpha = 1\%$ et 10 degrés de liberté (ddl). La différence entre les perméabilités de JMB 4 et JMB 5 est donc significative.

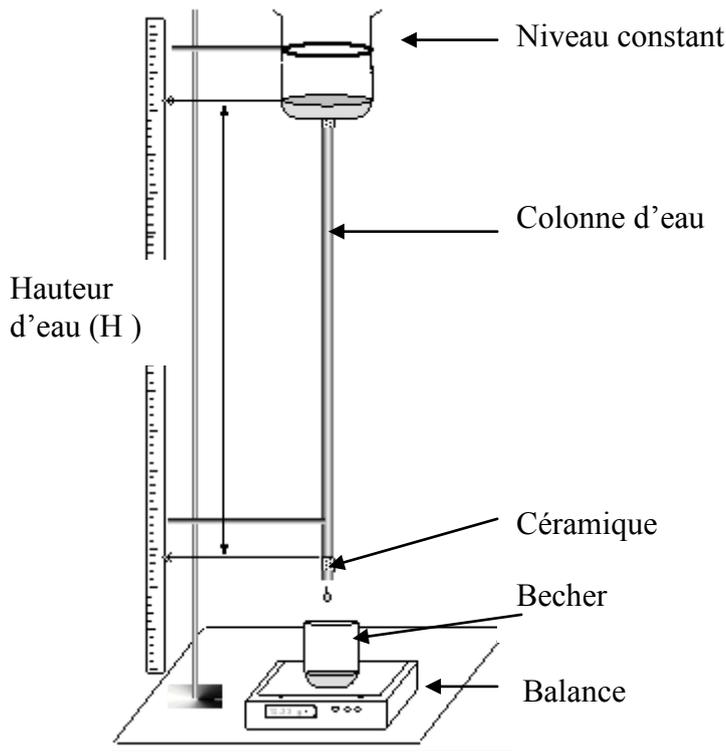
- *Technique utilisant le fluide « eau » :*

Notre deuxième technique de mesure de la perméabilité utilise donc l'eau comme fluide empruntant les canaux interconnectés de la céramique.

Cette méthode utilisant un fluide liquide a été utilisée par Nauman pour déterminer les perméabilités d'échantillons d'os trabéculaire (120), ou de substitut osseux d'origine corallienne (ProOsteon 500®) (75).

Les régimes d'écoulement de l'air ou de l'eau sont laminaires dans les conditions expérimentales retenues pour nos deux céramiques JMB 4 et JMB 5. La loi de DARCY (102), (103), (149), est donc applicable et permet le calcul des perméabilités des échantillons.

Nous avons fabriqué un perméamètre « à pression constante » selon les modalités définies par J. BEAR (8) : une colonne d'eau impose une pression constante sur un échantillon de céramique. L'eau transite au travers des canaux interconnectés de la céramique (figure 4).



Loi de DARCY :	
$k =$	$\frac{\eta \cdot L \cdot Q}{A \cdot P}$
	$P = 7848 \text{ Pascals si } H = 80 \text{ cm}$

Figure 4 : perméamètre à pression constante selon Bear (8)

La mesure de la masse d'eau recueillie par unité de temps permet de calculer le débit de fluide. En moyenne la hauteur de la colonne d'eau est de 80 cm induisant une pression de 7848 Pa appliquée sur la céramique.

Cette technique est largement utilisée par les géologues pour tester des échantillons de roches. Elle permet d'utiliser un fluide incompressible ce qui constitue un avantage, mais implique aussi de travailler à de faibles vitesses d'écoulement, donc de faibles pressions, pour respecter la laminarité de l'écoulement au travers des canaux interconnectés.

Les échantillons testés (9 de chaque céramique) sont de 2 types différents (JMB 4 et JMB 5) et sont taillés en forme de disque (4,5 à 5,5 mm de longueur pour 10,5 à 11 mm de diamètre).

Un pré traitement est réalisé sur chaque échantillon : pour améliorer la pénétration de l'eau dans les plus petits canaux de la céramique, la pièce de BCP est immergée 2 minutes dans une solution d'agent tensioactif (Tween 80 à 0,2 %) puis lavée à l'eau purifiée. La céramique est

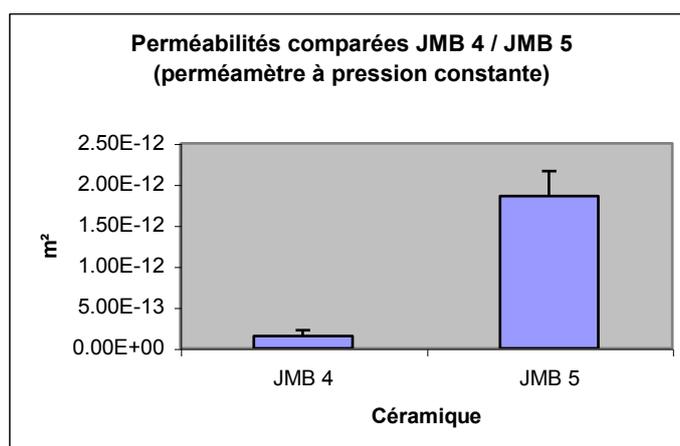
ensuite placée dans une cuve à ultrasons pendant 2 fois 30 secondes pour éliminer toute obstruction « parasite ».

Calcul du nombre de Reynolds critique (8) dans les conditions expérimentales :

- Le débit maximal expérimental pour JMB 4 était de $3.92 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ce qui correspond à un nombre de Reynolds $R_e = 1.8 \cdot 10^{-3}$
 - Le débit maximal expérimental pour JMB 5 était de $3.28 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ce qui correspond à un nombre de Reynolds $R_e = 1.7 \cdot 10^{-2}$
- (Viscosité cinématique de l'eau = $1.14 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et longueur d'un pore représentée par le diamètre moyen du grain (8) : $5 \mu\text{m}$ (MEB))

Les valeurs du nombre de Reynolds restent inférieures à 0.1 ce qui traduit un écoulement de nature laminaire. Il est donc légitime d'appliquer la loi de DARCY.

Les tableaux 2 et 3 présentent les valeurs des perméabilités des céramiques JMB 4 et JMB 5 calculées à partir de la loi de DARCY. Neuf échantillons ont été testés pour chaque type de céramique. Tout comme avec la technique de mesure de la perméabilité à l'air, c'est la céramique JMB 5 qui est la plus perméable avec une valeur moyenne de $k = 1,86 \text{ E}^{-12} \text{ m}^2$ contre $1.49 \text{ E}^{-13} \text{ m}^2$ pour JMB4 (graphique 3).



Graphique 3 : perméabilités comparées de JMB4 et JMB5

La comparaison des deux moyennes observées révèle $t_{\text{exp}} = 15,4$. La différence entre les perméabilités de JMB 4 et JMB 5 est donc significative ($t_{\text{lim}} = 2,9$ pour le risque $\alpha=1\%$ et 16 ddl).

Les deux techniques de mesure permettent donc de mettre en évidence un même écart de perméabilité entre les deux céramiques étudiées. En revanche, les résultats de perméabilité en valeur absolue varient selon la technique de mesure. Cette absence de concordance entre les valeurs de perméabilités obtenues par technique à l'eau ou technique à l'air est rapportée par la norme (126). Les liquides ne donnent des mesures concordantes avec les gaz que pour les pores de grandes tailles et pour une porosité fortement interconnectée ce qui n'est pas forcément le cas des céramiques phosphocalciques.

La littérature n'apporte pas de renseignements sur les valeurs de perméabilité des BCP. On connaît en revanche ce paramètre pour l'os trabéculaire (lapin, humain, bovin) et les substituts osseux d'origine corallienne.

	Perméabilité mini (m ²)	Perméabilité maxi (m ²)	Technique	Références
Os trabéculaire	$1,05 \cdot 10^{-12}$	$80,5 \cdot 10^{-10}$	Fluide = eau	Nauman (120)
Substitut osseux « proOsteon® »	$1,73 \cdot 10^{-10}$	$8,62 \cdot 10^{-10}$	Fluide = eau	Haddock (75)
BCP macroporeux	$8,18 \cdot 10^{-15}$	$1,06 \cdot 10^{-13}$	Fluide = air	Lecomte (97)
BCP macroporeux	$1,49 \cdot 10^{-13}$	$1,86 \cdot 10^{-12}$	Fluide = eau	Lecomte (97)

Tableau 2 : Perméabilités de différents substituts osseux biologiques ou de synthèse

La perméabilité de l'os trabéculaire n'est donnée ici qu'à titre indicatif car les structures des BCP d'une part et de l'os trabéculaire d'autre part sont totalement différentes et donc difficilement comparables. La comparaison est en revanche beaucoup plus légitime entre les céramiques phosphocalciques et les substituts osseux d'origine corallienne. La structure des BCP est à l'origine d'une perméabilité bien inférieure à celle des dérivés du corail qui constituent un modèle de porosité hautement interconnectée.

HUI et al (83) ont montré que la valeur de la perméabilité était prédictive de la bonne ostéointégration d'une greffe osseuse chez le porc. Un greffon de conductance inférieure à $1,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (équivalent à une perméabilité de l'ordre de 10^{-11} m^2 dans les conditions expérimentales) promeut la repousse osseuse. Les échantillons de moindre perméabilité ne permettent pas la colonisation cellulaire et l'intégration du greffon à l'os.

Par ailleurs HADDOCK et al (75) montrent que perméabilité et orientation des pores sont intimement liées dans le cas des substituts osseux d'origine corallienne. L'auteur propose donc un choix du substitut osseux de type PRO-OSTEON® fonction de son site d'implantation et basé sur la perméabilité. Par ailleurs il suggère qu'une perméabilité élevée favoriserait l'incorporation biologique de l'implant en servant de guide à la néo-vascularisation préalable à la colonisation du substitut osseux.

Deux hypothèses s'affrontent aujourd'hui pour expliquer l'importance d'un niveau de perméabilité suffisant pour un substitut osseux une fois implanté (74) :

- La théorie du « blood clot », littéralement « bouchon de sang », qui suggère que préalablement au phénomène de néoangiogenèse qui survient au cœur de l'implant, les pores interconnectés jouent le rôle de canaux au travers desquels le sang peut circuler. Le débit de sang étant proportionnel au calibre des canaux (loi de Poiseuille), l'auteur émet l'hypothèse qu'un trop petit diamètre peut être à l'origine de la formation d'un caillot embolisant la lumière du trajet poreux.
- La perméabilité pourrait aussi être une mesure de la « facilité d'accès » offerte par l'implant aux tissus et aux cellules pénétrant au cœur du matériau.

1.1.1.2.2 - Mesure du facteur de tortuosité d'un échantillon poreux :

Le facteur de tortuosité (τ_f), un autre paramètre reflétant le degré d'interconnexion, est un paramètre géométrique qui dépend des caractéristiques des trajets poreux. Il est défini comme le carré du rapport « longueur réelle du pore » (L_e) sur la « longueur projetée selon une direction parallèle au flux » (L) et n'a pas d'unité (figure 5).

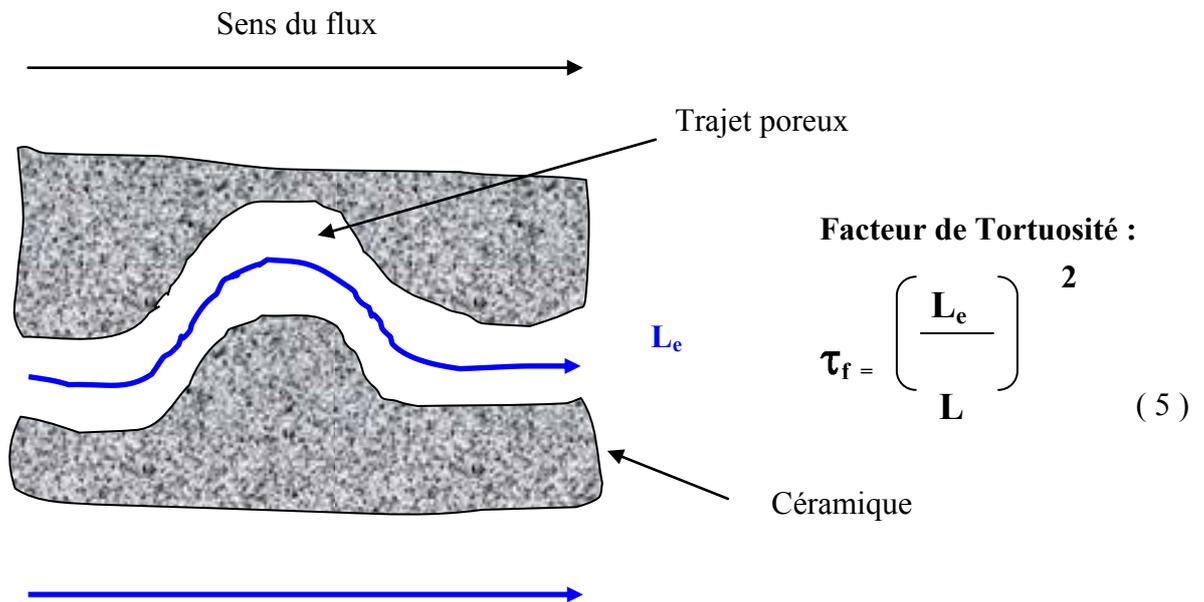


Figure 5 : principe de la mesure de la tortuosité

Pour calculer ce paramètre, nous nous sommes appuyés sur les expériences menées par T. BOVING qui a déterminé le facteur de tortuosité de différentes roches en mettant à profit les propriétés de diffusion (mouvement Brownien) d'un ion traceur (Iodures) au travers du réseau poreux de l'échantillon (24).

En raison de la multiplicité des trajets interconnectés, le facteur de tortuosité ne peut être mesuré directement et l'auteur s'appuie sur la deuxième loi de diffusion de FICK (Annexe 1) pour déterminer le coefficient de diffusion expérimental (D_{exp}) du traceur lequel permet le calcul du facteur de tortuosité selon la relation :

$$\tau_f = \frac{D_{aq} \cdot \varepsilon}{D_{exp}} \quad (6)$$

Avec ε la porosité obtenue par porosimétrie à mercure et D_{aq} [$m^2 \cdot s^{-1}$] le coefficient de diffusion du traceur dans l'eau pure ($= 1,86 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1}$ pour le traceur iodures).

Pour déterminer le coefficient de diffusion expérimental du traceur D_{exp} , nous avons construit conformément aux directives de l'auteur, une cuve de diffusion dont le modèle est présenté ci dessous.

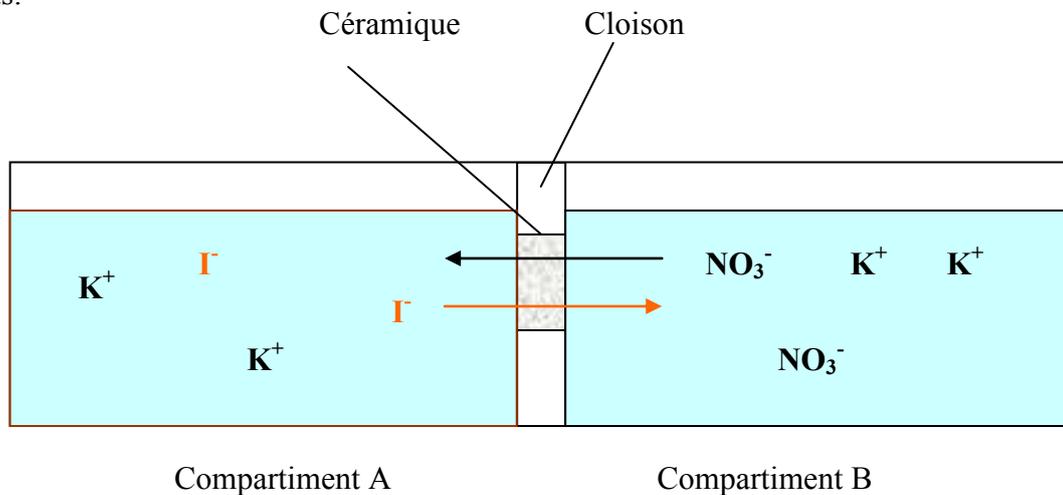


Figure 6 : cuve de diffusion pour diffusion des iodures selon T. BOVING (24)

Une cuve de diffusion comprend 2 compartiments séparés par une cloison dans laquelle est inséré le disque de céramique. Le compartiment A est rempli d'une solution d'Iodure de Potassium ($[KI] = 0,1$ moles / l), le compartiment B est rempli d'une solution de Nitrate de Potassium de même concentration (figure 6).

Les 2 types de céramiques, JMB 4 et JMB 5, ont été taillées en disques de 10,5 à 11 mm de diamètre et de 4,5 à 5,5 mm d'épaisseur. Les échantillons ont été au préalable traités par immersion pendant 2 minutes dans une solution de Tween à 0,2 % pour améliorer la mouillabilité des trajets poreux, puis lavés à l'eau purifiée et placés pendant 2 fois 30 secondes dans une cuve à ultrasons pour éliminer les obstructions parasites.

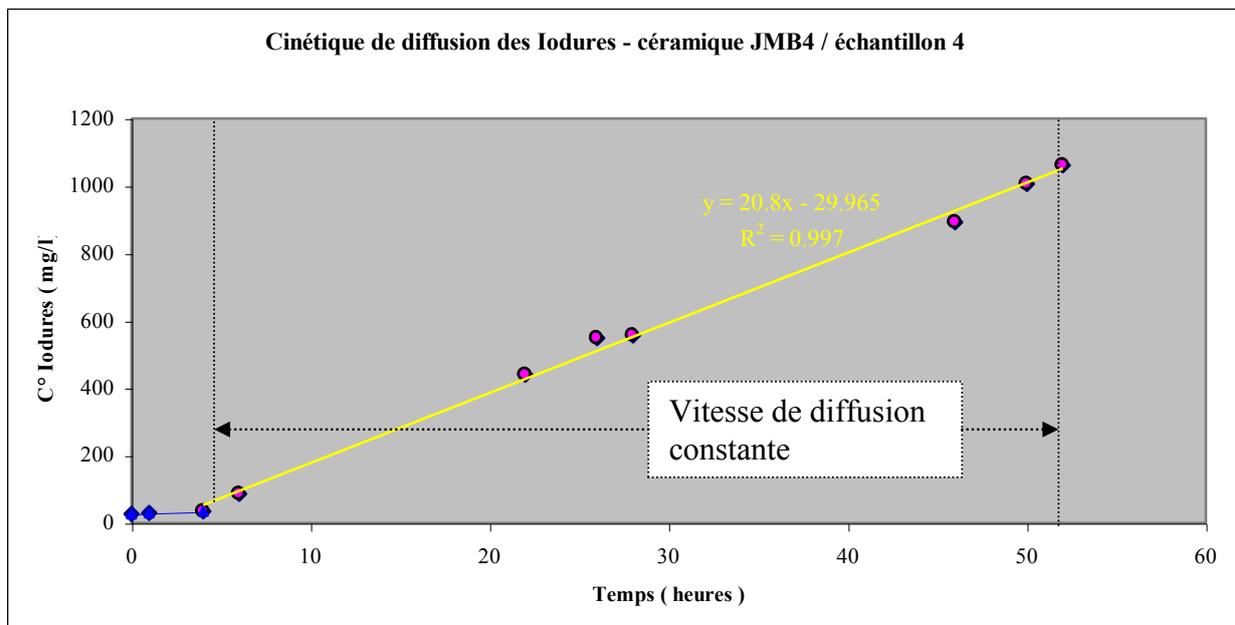
Par diffusion, les Iodures empruntent les canaux interconnectés en suivant le gradient de concentration (de A vers B). On réalise une mesure de la cinétique d'apparition des Iodures dans le compartiment B et la pente de la droite obtenue permet le calcul de D_{exp} (Annexe 1).

Le dosage des iodures est réalisé selon une méthode colorimétrique (130), (Annexe 2). Cette technique permet la réalisation d'un micro prélèvement (50 μ l) tout en conservant une excellente sensibilité (2 ppm).

Il convient de noter que les expériences de diffusion ont eu lieu sous température contrôlée (19 à 22°C) et dans une pièce noire pour éviter toute dégradation des Iodures.

On réalise le dosage des ions iodures qui ont traversé le réseau poreux de la céramique et sont apparus dans le deuxième compartiment. En général une cinétique s'étend sur 45 à 60 heures.

Le profil des courbes $[I^-] = f(\text{temps})$ est toujours le même : après une courte période de mise à l'équilibre, la vitesse de passage des iodures dans le deuxième compartiment est constante et la courbe devient une droite (graphique 4). La répétabilité de la technique de dosage des iodures a été testée sur 10 gammes étalons $[I^-] = f(\text{Absorbance})$. Le coefficient de variation expérimental est de moins de 6 %.



Graphique 4 : Cinétique d'apparition des ions iodures par diffusion dans le compartiment B

Résultats des coefficients de diffusion et de tortuosité de la céramique JMB 4 :

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8
D exp (m²/s)	2.15 E-11	2.08 E-11	2.54 E-11	2.82 E-11	3.50 E-11	2.02 E-11	2.27 E-11	2.57 E-11
Tortuosité	47.6	49.2	40.2	36.3	29.2	50.6	45.1	39.8

Tableau 3 : valeurs des coefficients de diffusion expérimentaux et des tortuosités de la céramique JMB 4

Facteur de tortuosité moyen pour JMB 4 : 42,3

Ecart type : 6,8

Résultats des coefficients de diffusion et de tortuosité de la Céramique JMB 5 :

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8
D exp (m ² /s)	6.6 E-11	1.34 E-10	9.93 E-11	9.12 E-11	9.17 E-11	7.21 E-11	7.15 E-11	9.88 E-11
Tortuosité	16.9	8.3	11.2	12.2	12.2	15.5	15.6	11.3

Tableau 4 : valeurs des coefficients de diffusion expérimentaux et des tortuosités de la céramique JMB 5

Facteur de tortuosité moyen pour JMB 5 : 12,9

Ecart type : 2,7

La comparaison des deux moyennes observées révèle un $t_{exp} = 10,6$. La différence entre les tortuosités de JMB 4 et JMB 5 est donc significative ($t_{lim} = 3,0$ pour le risque $\alpha=1\%$ et 14 ddl).

Tout comme pour la perméabilité, nous ne disposons pas de valeur de référence pour la tortuosité des céramiques biphasées. Les roches calcaires de structure macro et microporeuses ont des facteurs de tortuosité pouvant varier de 2,1 à 102 d'après Tom Boving (24). Il n'est pas légitime de comparer une céramique poreuse (phosphate de calcium) biphasée à une roche calcaire (carbonate de calcium) en raison de leurs architectures et leurs modes de fabrication très différents. Néanmoins les valeurs des coefficients de tortuosité calculés pour les céramiques JMB 4 et JMB 5 apparaissent cohérentes et vraisemblables.

En l'état actuel des connaissances on ne connaît pas l'impact d'une tortuosité donnée sur la cinétique de dégradation de l'implant ou la néoformation osseuse. Néanmoins, et par analogie avec les phénomènes décrits pour les comprimés matriciels à libération prolongée utilisés dans le domaine pharmaceutique (10), (57), on peut prédire une forte influence de la tortuosité sur les phénomènes de dissolution de la matrice phosphocalcique et sur la libération de principe actif en cas d'association matrice / molécule médicamenteuse (Facteur de croissance, Antibiotique, Anticancéreux, ...) (3).

Les expériences de diffusion menées pour déterminer la tortuosité de nos échantillons impliquaient l’immersion prolongée de l’échantillon (plusieurs dizaines d’heures). Un biais à cette expérience pourrait être la dissolution de la matrice phosphocalcique qui tend à élargir les trajets poreux. Pour étudier ce phénomène, nous avons calculé les perméabilités (perméabilité à pression constante) de chaque échantillon avant et après immersion dans la cuve de diffusion. Les résultats montrent une augmentation de perméabilité non significative d’un point de vue statistique pour JMB 4 et JMB 5. L’augmentation de perméabilité est très faible, + 2,8% pour JMB 4 au bout de 51H d’immersion versus + 3,9 % pour JMB 5 après 56H d’immersion. Nous considérons donc que l’architecture poreuse des céramiques n’a pas été modifiée significativement et que les mesures des coefficients de tortuosité sont pertinentes.

1.1.1.2.3 – Porosimétrie à mercure et logiciel Pore-Cor® : Etude structurale de la porosité

1.1.1.2.3.1 - Porosimétrie à mercure :

- Principe de la technique :

L’analyse de la porosité d’un échantillon par « porosimétrie à mercure » exploite un phénomène physique bien connu qui veut qu’un solide poreux immergé dans un liquide « non mouillant » ne puisse pas pénétrer par capillarité à l’intérieur du solide. Seule l’application d’une force extérieure permet au liquide d’envahir le réseau poreux du solide. Le mercure a été choisi en raison de ses propriétés physiques et notamment de sa très faible mouillabilité (155).

Washburn a découvert en 1921 qu’il existait une relation de proportionnalité inverse entre la pression appliquée et le diamètre du pore envahi par le mercure.

$$d = \frac{4 \gamma \cos \theta}{P} \quad (7)$$

Loi de WASHBURN-LAPLACE

Avec γ (= 450 Dynes / cm) la tension inter faciale du mercure, θ (= 130 °) l'angle de contact mercure / surface poreuse, P [Pa] la pression appliquée sur le mercure, et d [m] le diamètre du pore.

On réalise le suivi du volume d'intrusion de mercure dans l'échantillon fonction de la pression appliquée (courbe Volume cumulé d'intrusion = f (Pression)). Le diamètre d'une classe de pore étant proportionnel à la pression, il devient facile de calculer la répartition des pores au sein de l'échantillon. Au prix d'une transformation à l'aide de la loi de Laplace Washburn, les résultats sont ensuite exprimés en *Volume cumulé d'intrusion* fonction du *diamètre des pores* correspondant à la pression d'intrusion. (figure 7).

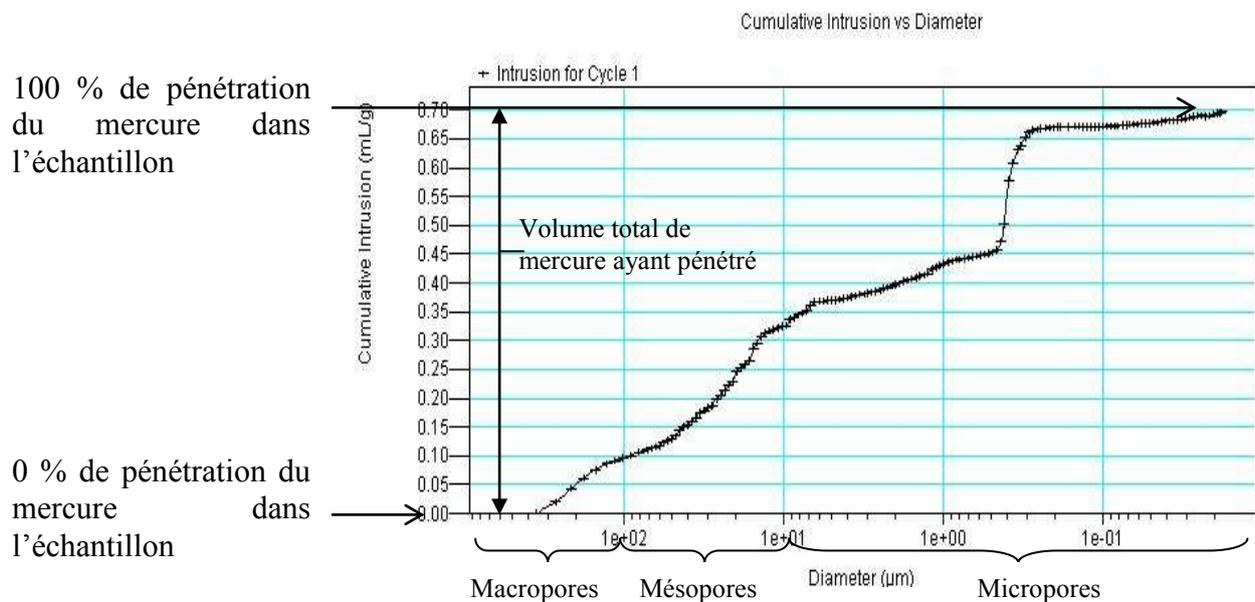


Figure 7 : Exemple de courbe d'intrusion de mercure (TRIOSITE®). *Volume cumulé d'intrusion = f (diamètre des pores)*.

Les autres informations sur la structure de l'échantillon pouvant être obtenues à partir de la courbe d'intrusion de mercure sont notamment :

- la *porosité* de l'échantillon,
- la *surface du réseau poreux*,
- le diamètre médian d'un pore,

Application à l'étude de la porosité des BCP :

Les mesures ont été réalisées sur un appareil de type : « Autopore III », commercialisé par la société Micromeritics® - Atlanta USA, couplé au logiciel d'exploitation Win 9400.

Nous avons testé 10 échantillons de chaque type de céramique (JMB 4 et JMB 5) pour le paramètre « porosité » et étudié les proportions relatives des différentes classes de pores.

- Céramique JMB 4 :

La courbe « volume de mercure ayant pénétré = f (diamètre de pore) » (figure 8) révèle 3 pics correspondant à 3 catégories de pores au sein de la céramique JMB 4.

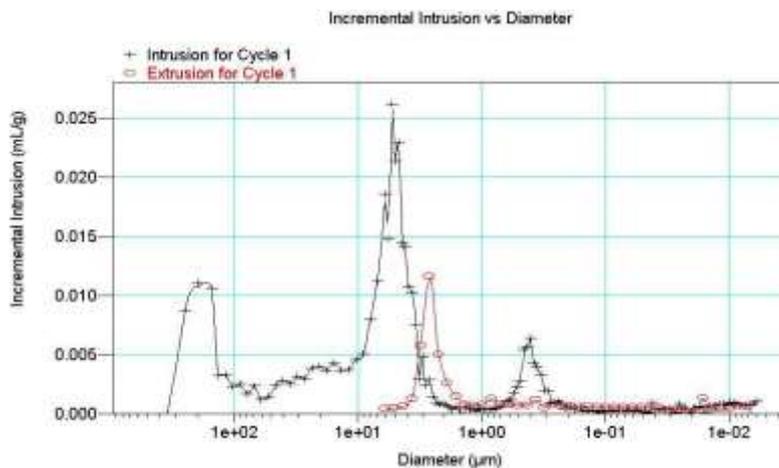


Figure 8 : volume d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores pour JMB 4

La porosité de la céramique JMB 4 déterminée par porosimétrie à mercure est de 54 % et le volume poreux se divise en :

- 8,5 % de Macropores (diamètre médian : 192 µm)
- 13,4 % de Mésopores (diamètre médian : 5.4 µm)
- 78,1 % de Micropores (diamètre médian : 0 .4 µm)

- Céramique JMB 5 :

La courbe « volume de mercure ayant pénétré = f (diamètre de pore) » (figure 9) révèle 2 pics correspondant à 2 catégories de pores au sein de la céramique JMB 5.

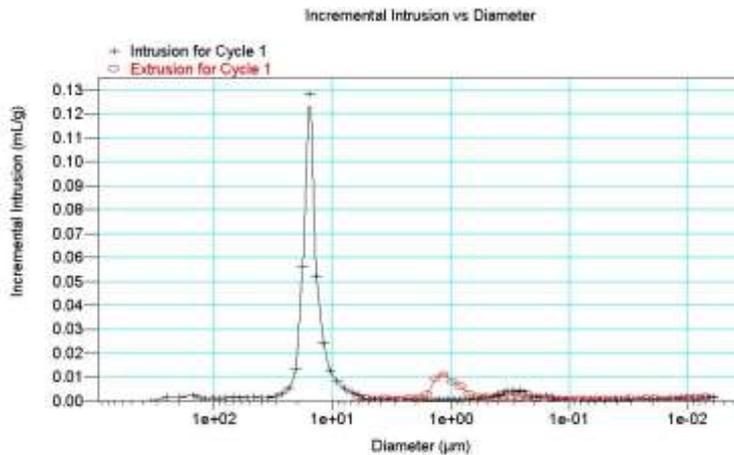


Figure 9 : volume d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores pour JMB 5

La porosité de la céramique JMB 5 déterminée par porosimétrie à mercure est de 60 % dont :

- 1.9 % de Macropores
- 66.5 % de Mésopores (diamètre médian : 16.4 µm)
- 31.6 % de Micropores (diamètre médian : 0.3 µm)

1.1.1.2.3.2- Logiciel PORE COR® (Pore Level Properties Correlator):

Il s'agit d'un logiciel développé par Micromeritics®, destiné à modéliser les milieux macro et méso poreux (131), (132), et qui a été testé avec succès pour la représentation des roches calcaires, des grès, de revêtements spéciaux destinés à l'industrie du papier, ou de pellets catalyseurs. Aucune étude n'a été conduite à ce jour dans le domaine des biomatériaux à l'aide de ce type d'outil.

- Principe du logiciel « Pore Cor® » :

Le logiciel Pore Cor® utilise les données acquises par porosimétrie à mercure en les intégrant dans un algorithme de percolation basé sur l'équation de Washburn-Laplace et

similaire à celui décrit par TSAKIROGLOU and PAYATAKES (147). L'utilisation conjointe des lois de DARCY et de POISEUILLE permet par ailleurs le calcul de la perméabilité de l'échantillon (111), (112), (131), (132).

L'intrusion de mercure est d'abord simulée par le logiciel puis comparée à la courbe d'intrusion expérimentale de l'échantillon. Le programme fait converger la courbe expérimentale vers la courbe simulée.

- Modélisation du volume poreux interconnecté :

Pore Cor® modélise le réseau poreux de l'échantillon sous la forme d'un ensemble d'unités cubiques (=pores) connectées ou non les unes aux autres par des canaux cylindriques (=canaux d'interconnexion). Les résultats sont exprimés sous la forme d'une cellule dans laquelle les unités cubiques et les canaux d'interconnexion sont répartis de manière aléatoire.

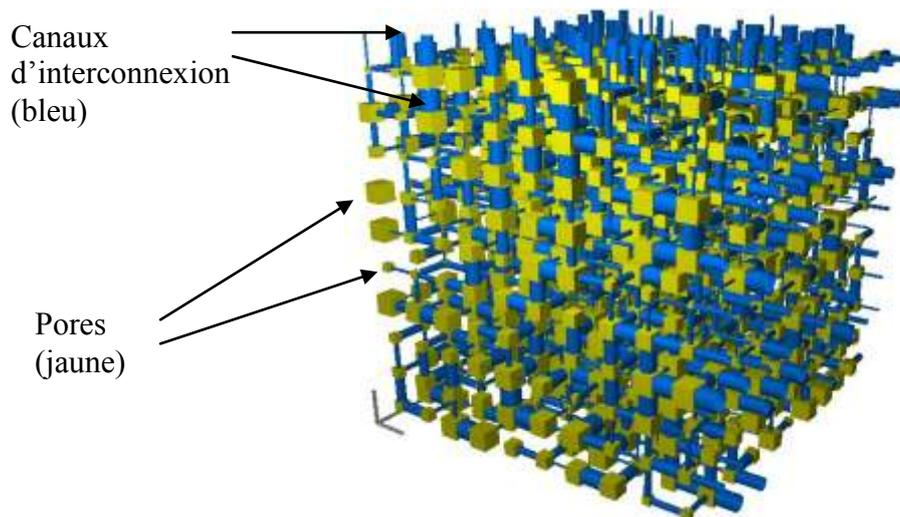


Figure 10 : Exemple de représentation des volumes poreux interconnectés d'un échantillon de céramique

- Fonctionnalités de Pore Cor® :

Les fonctionnalités et flux d'informations gérés par le logiciel sont complexes mais le point de départ de tout calcul mené par le logiciel passe par la mesure des tailles de pores et de leur répartition au sein de l'échantillon.

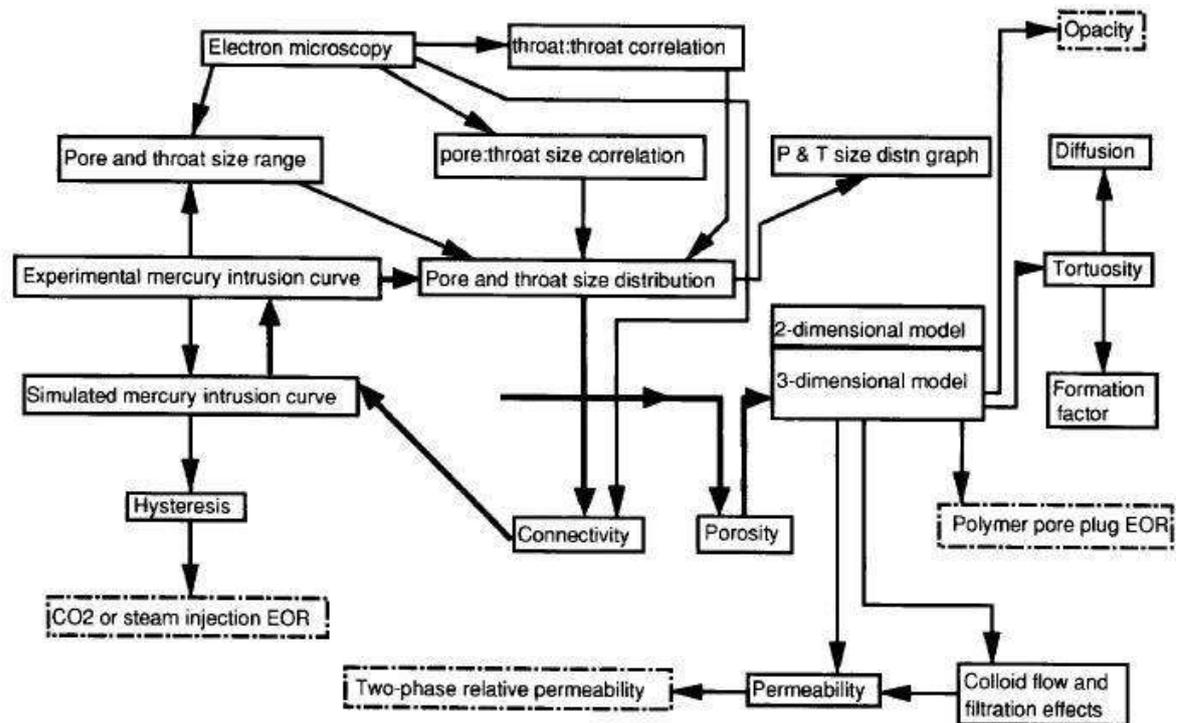


Figure 11 : Fonctionnalités et flux d'informations de Pore Cor® d'après MATTHEWS (111)

- Mesures réalisées à partir du logiciel Pore Cor® :

Au delà de la figure 11 qui répertorie toutes les fonctionnalités offertes par le logiciel Pore Cor®, dans le cadre de notre étude nous avons retenu les paramètres suivants :

- Perméabilité : paramètre calculé à partir de la loi de DARCY et de la loi de POISEUILLE. Nous avons travaillé sur des perméabilités fractionnées (perméabilité correspondant à une taille de pore) afin d'obtenir une meilleure adéquation entre les courbes d'intrusion de mercure expérimentales et simulées.
- Facteur de tortuosité : paramètre calculé à partir de 100 « routes » prises au hasard au travers de la cellule poreuse modélisée par le logiciel. Nous avons travaillé sur des tortuosités fractionnées (tortuosité correspondant à une taille de pore) afin d'obtenir une meilleure adéquation entre les courbes d'intrusion de mercure expérimentales et simulées.
- La valeur D_{50} : qui est le diamètre du pore correspondant au point d'inflexion de la courbe d'intrusion de mercure au sein de la céramique. Elle représente le diamètre médian des pores impliqués dans la connectivité et la perméabilité.

Les évaluations ont porté sur 10 céramiques de chaque type (JMB 4 et 5)

Le calcul des perméabilités, facteurs de tortuosité, diamètres équivalents à 50 % du remplissage des pores par le mercure (D_5), est réalisé à partir de la courbe d'intrusion de mercure dans l'échantillon. Cette courbe réalise le suivi du pourcentage de mercure ayant pénétré dans la céramique (en volume) fonction du diamètre des pores. Elle est habituellement de forme sigmoïdale avec un point d'inflexion qui correspond au D_{50} . Lorsque le profil d'intrusion de mercure diffère, le logiciel impose le découpage de la courbe en plusieurs sigmoïdes. Les courbes obtenues permettent le calcul des perméabilités et des facteurs de tortuosité fractionnés ainsi que la modélisation des volumes poreux pour chaque classe de pores.

La courbe d'intrusion de mercure pour les céramiques étudiées présente un aspect bimodal (2 sigmoïdes). Nous l'avons donc fractionné en :

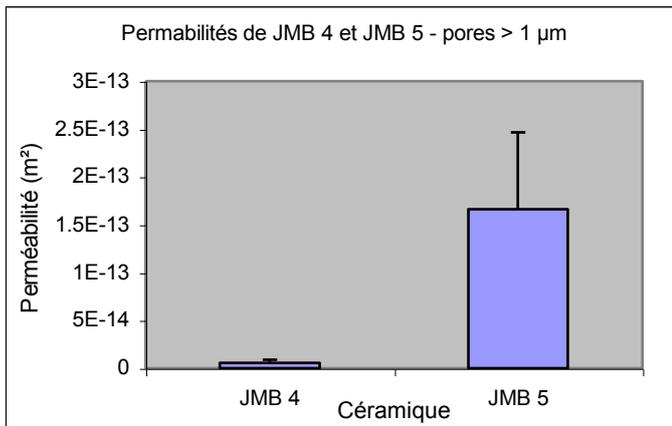
- Pores de diamètres $> 1 \mu\text{m}$
- Pores de diamètres compris entre 0.1 et 1 μm

Un exemple de courbe d'intrusion fractionnée figure en Annexe 5.

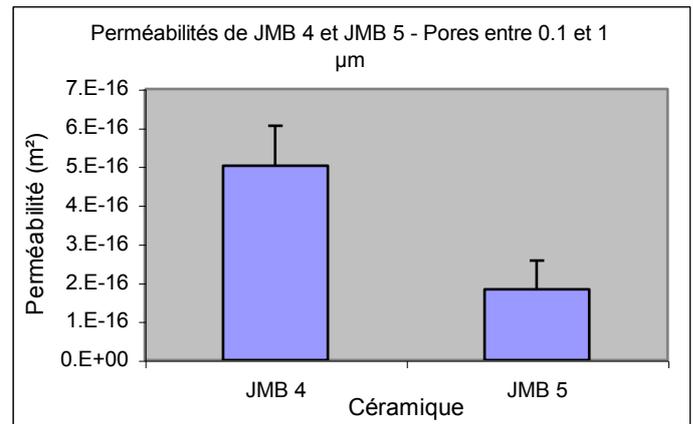
- Résultats de perméabilité de JMB 4 et JMB 5 déterminés à l'aide de Pore Cor:

Nous observons une différence significative de perméabilité entre les deux céramiques pour les deux classes de pores observées :

- pour les pores $> 1 \mu\text{m}$, $t_{\text{exp}} = 6,0 > t_{\text{lim}}$. JMB 5 apparaît donc plus perméable que JMB 4 pour cette classe de pores
- pour les pores compris entre 0,1 et $1 \mu\text{m}$, $t_{\text{exp}} = 7,5 > t_{\text{lim}}$. JMB 4 apparaît donc plus perméable que JMB 5 pour cette classe de pores.



Graphique 5 : Perméabilités comparées des pores de plus de 1 µm.



Graphique 6 : Perméabilités comparées des pores compris entre 0,1 et 1 µm

Les pores de plus de 1 µm de diamètre sont à l'origine d'une perméabilité 30 fois supérieure de JMB 5 par rapport à JMB 4.

Les pores de diamètre 0,1 à 1 µm de diamètre sont à l'origine d'une perméabilité 3 fois supérieure de JMB 4 par rapport à JMB 5.

La quasi totalité de la perméabilité est apportée par les pores de plus de 1µm de diamètre pour la céramique JMB 5. En revanche la perméabilité de JMB 4 est apportée à 90 % par les pores de diamètre supérieur à 1 µm, les 10 % restants étant dus aux pores de diamètre compris entre 0,1 et 1 µm

Les résultats en valeur absolue des perméabilités diffèrent de ceux retrouvés par les techniques précédentes car :

- Il s'agit de perméabilités partielles correspondant à une classe de pores
- Le logiciel a tendance à sous estimer les valeurs des perméabilités. Matthews relève une erreur par défaut d'un facteur 1000 environ entre les valeurs de perméabilités simulées par le logiciel et celles obtenues par méthodes physiques pour l'étude d'échantillons rocheux (111), (112). L'auteur considère donc que les perméabilités fournies par le logiciel Pore Cor doivent être comprises comme des valeurs relatives.

- Résultats des tortuosités des céramiques JMB 4 et JMB 5 déterminées à l'aide Pore Cor®:

Tout comme pour les perméabilités, il convient de raisonner en tortuosités fractionnées :

- Tortuosités des pores de diamètre supérieur à $1\mu\text{m}$
- Tortuosités des pores de diamètre compris entre $0,1$ et $1\mu\text{m}$

Un message d'erreur est apparu pour bon nombre des simulations effectuées par le logiciel signalant sa difficulté à calculer le coefficient de tortuosité en raison du faible nombre de trajets poreux connectés au sein de l'échantillon. Le mode de calcul de la tortuosité s'appuie sur l'étude du trajet d'une particule empruntant le réseau poreux interconnecté modélisé par l'algorithme du logiciel. L'opération est renouvelée une centaine de fois pour obtenir la tortuosité médiane des trajets empruntés. Si l'interconnexion est insuffisante pour une classe de pores donnée, la valeur de la tortuosité médiane des trajets poreux n'est plus exacte.

Il nous est donc apparu que le logiciel Pore Cor® n'était pas adapté à la mesure des coefficients de tortuosité de nos échantillons de céramiques.

- Calcul des diamètres équivalents à 50 % du remplissage des pores par le mercure (D_{50}) déterminés à l'aide Pore Cor®:

Les valeurs des D_{50} pour les pores $0,1$ à $1\mu\text{m}$ et les pores $> 1\mu\text{m}$ sont données en Annexe 8. Nous observons une différence significative des D_{50} entre les deux céramiques pour les deux classes de pores observées :

- pour les pores $> 1\mu\text{m}$, $t_{\text{exp}} = 24,0 > t_{\text{lim}}$ et JMB 5 possède un D_{50} 2,6 fois plus grand que JMB 4.

- pour les pores compris entre $0,1$ et $1\mu\text{m}$, $t_{\text{exp}} = 13,6 > t_{\text{lim}}$ et JMB 4 possède un D_{50} 30 % plus grand que JMB 4.

Il convient de noter que le diamètre équivalent à 50 % du remplissage des pores par le mercure représente le diamètre correspondant au point d'inflexion de la courbe d'intrusion de mercure.

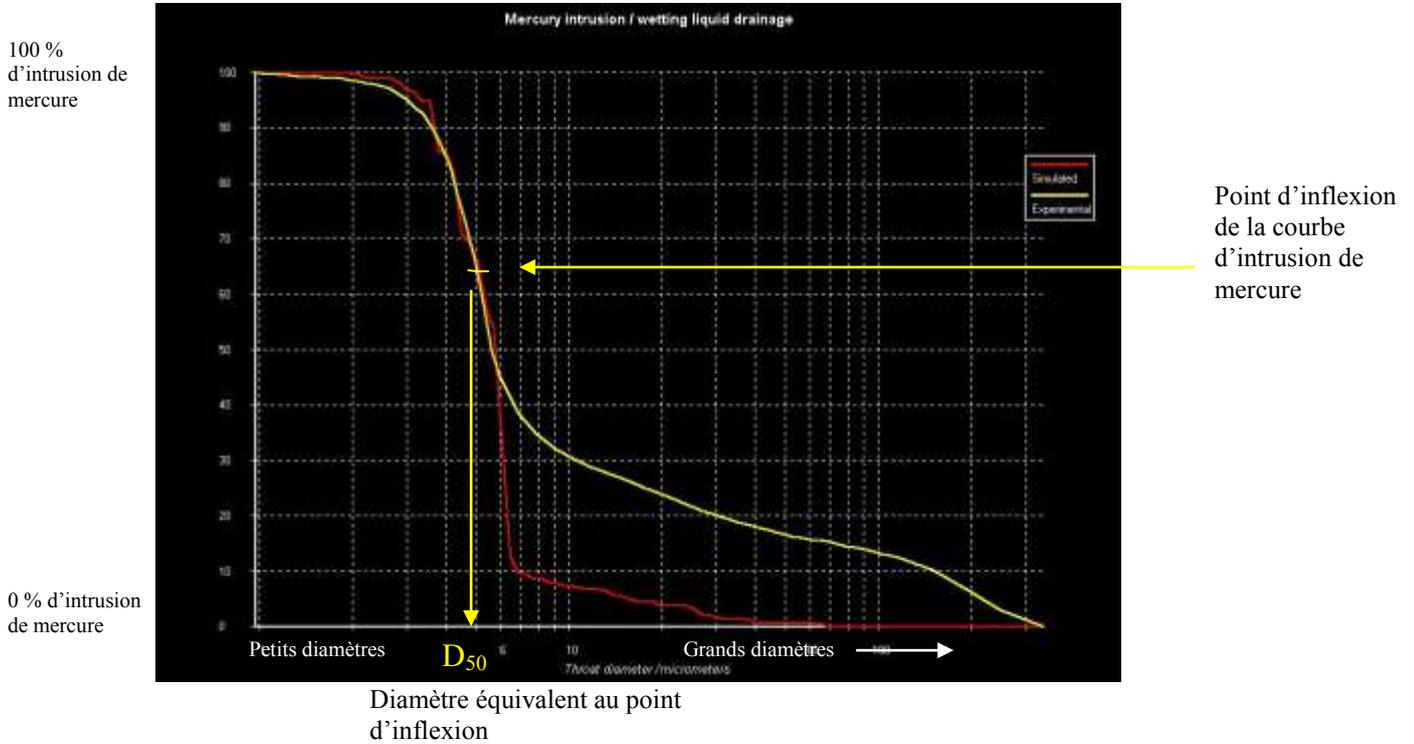


Figure 12 : Courbe d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores

D'après Matthews et al (111), (112), le gradient de la courbe d'intrusion de mercure est gouverné par l'interconnexion. De fortes valeurs d'interconnexion auront pour effet de déplacer la courbe d'intrusion de mercure vers la droite, c'est à dire vers les grands diamètres de pores . Ainsi plus le diamètre équivalent au point d'inflexion est élevé, plus le mercure pénétrera facilement au cœur de la céramique. Le diamètre équivalent à 50 % du remplissage des pores par le mercure (D_{50}) reflète donc le niveau de l'interconnexion de l'échantillon.

Pour la classe de pores de diamètre supérieur à 1 μm , le diamètre équivalent au point d'inflexion est 2,6 fois plus élevé pour JMB 5 par rapport à JMB 4. Les pores de JMB 5 sont donc plus interconnectés et plus aptes à offrir des trajets poreux permettant le transfert de fluides ou de particules.

- Modélisation des volumes poreux :

Modélisation de la porosité interconnectée de JMB 4 : Exemple de l'échantillon N° 1

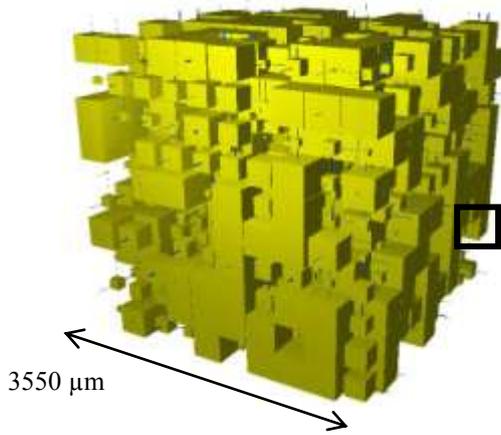


Figure 13 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores > 1 micron

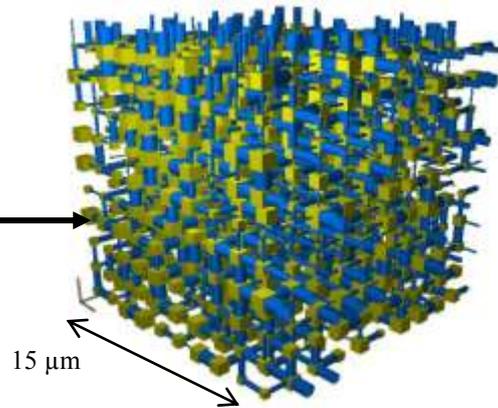


Figure 14 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores de 0.1 à 1 microns

Modélisation de la porosité interconnectée de JMB 5 : Exemple de l'échantillon N° 4 :

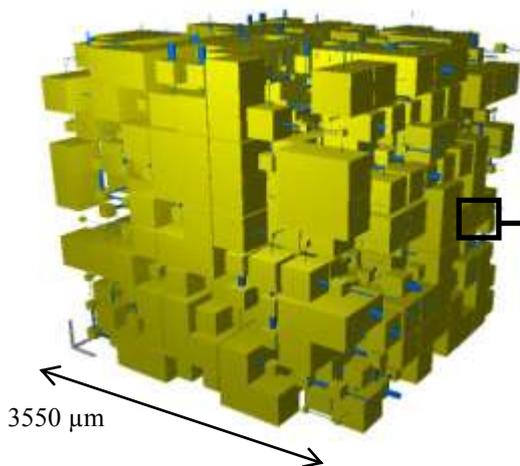


Figure 15 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores > 1 micron

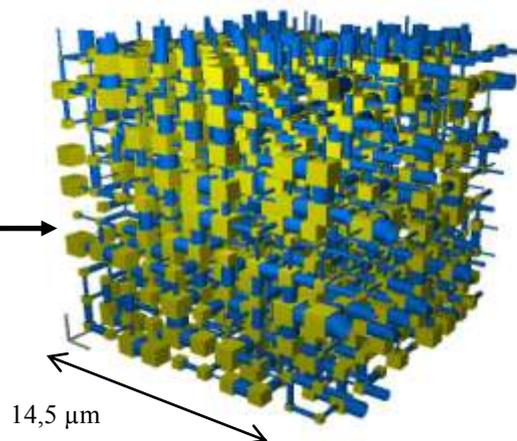


Figure 16 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores de 0.1 à 1 microns

1.1.1.2.4 – Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Analyse d'image : Etude de la Macro et Microporosité

Le microscope électronique à balayage permet l'étude de surface d'un échantillon massif. Son principe repose sur le bombardement d'une surface par des électrons primaires. La pénétration de ces électrons est peu importante et limitée à un petit volume. Dans ce volume, les électrons subissent des pertes énergétiques et provoquent l'excitation d'autres électrons. Ces derniers appelés électrons secondaires permettent l'observation de surface.

Les informations obtenues par MEB sur la porosité de l'échantillon complètent les données précédemment acquises puisque les pores d'un grand diamètre ($> 360 \mu\text{m}$) ne sont pas accessibles par porosimétrie à mercure alors qu'ils sont visibles au MEB.

1.1.1.2.4.1 - Préparation des échantillons pour observation au MEB : la métallisation

Les échantillons de BCP doivent être inclus dans la résine puis métallisés avant observation (Annexe 3). La métallisation a pour but de recouvrir l'échantillon d'une mince couche d'un métal conducteur (5 à 6 μm) pour éviter les phénomènes d'échauffement liés à la pénétration des électrons pouvant entraîner la destruction de l'échantillon.

1.1.1.2.4.2 – Analyse d'image :

L'analyse d'image repose sur le contraste existant entre le biomatériau apparaissant en clair et les pores (vides) apparaissant en sombre lors de l'observation des blocs de BCP au MEB. Le MEB utilisé pour cette étude est un appareil JEOL JSM 6300, sous une tension variant de 10 à 20 kV. L'image est numérisée, enregistrée puis transférée sur un poste d'analyse d'images (PC LEICA Q500MC) où elle est filtrée et analysée pour en tirer des données quantitatives sur la composition de l'échantillon analysé. Cette exploitation repose sur l'analyse de 256 niveaux de gris.

1.1.1.2.4.3 - Paramètres mesurés :

- Analyse de la macro et méso porosité : Nous avons étudié :
 - Le % de macropores « en surface » (Surface des macropores / Surface totale *100)
 - Le % de mésopores « en surface » (Surface des mésopores / Surface totale *100)
- Analyse de la micro porosité :

Nous avons étudié par analyse d'image le % de micropores « en surface » (surface des micropores / Surface totale *100).

L'analyse est menée sur 6 images de JMB 4 au grossissement X 20 et 20 images de JMB 5 au grossissement X 30.

1.1.1.2.4.4 – Porosité et répartition de la porosité par analyse d'image :

En analyse d'image, la céramique JMB 4 apparaît essentiellement macroporeuse avec 43 % (en surface) de macropores contre 6 % de micropores et une absence de mésopores.

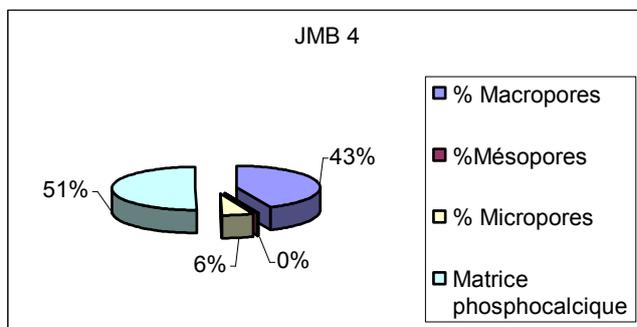


Figure 17 : Etude des proportions relatives des différentes classes de pores de JMB 4 en analyse d'image

En analyse d'image la céramique JMB 5 est essentiellement macroporeuse. Elle possède environ 5 % en surface de méso et de micropores. La porosité totale de JMB 5 est inférieure à celle de JMB 4 (46 % contre 49 %).

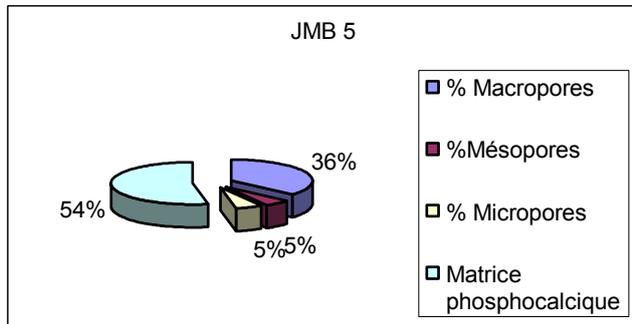


Figure 18 : Etude des proportions relatives des différentes classes de pores de JMB 5 en analyse d'image

La porosimétrie à mercure montre que la céramique JMB 4 possède une porosité totale de 54 % dont la majorité est représentée par des micropores (78 % de micropores en volume). Cette valeur de porosité totale est confirmée par analyse d'image, en revanche la répartition en classes de pores est quelque peu modifiée avec cette technique d'analyse : nous relevons une majorité de macropores par analyse d'images (43 % en surface) et très peu de micropores (6 % en surface). La différence entre ces deux techniques s'explique par le fait que :

- la porosimétrie à mercure, à l'inverse de l'analyse d'image par MEB ne détecte pas les pores d'un diamètre supérieur à 360 μm et sous estime la part relative des macropores
- la technique de porosimétrie à mercure a tendance à surestimer la part relative des micropores au détriment des macro et méso pores.
- L'analyse d'image repose sur une extrapolation tridimensionnelle des observations réalisées sur des clichés bidimensionnels.

Fonction des avantages et inconvénients respectifs de chaque technique, il a été choisi d'utiliser la porosimétrie à mercure pour la détermination de la porosité totale alors que les proportions relatives des différentes classes de pores sont données par analyse d'image. Cette stratégie nous permet d'être en accord avec les tailles de pores observées au MEB (figures 19 et 20)

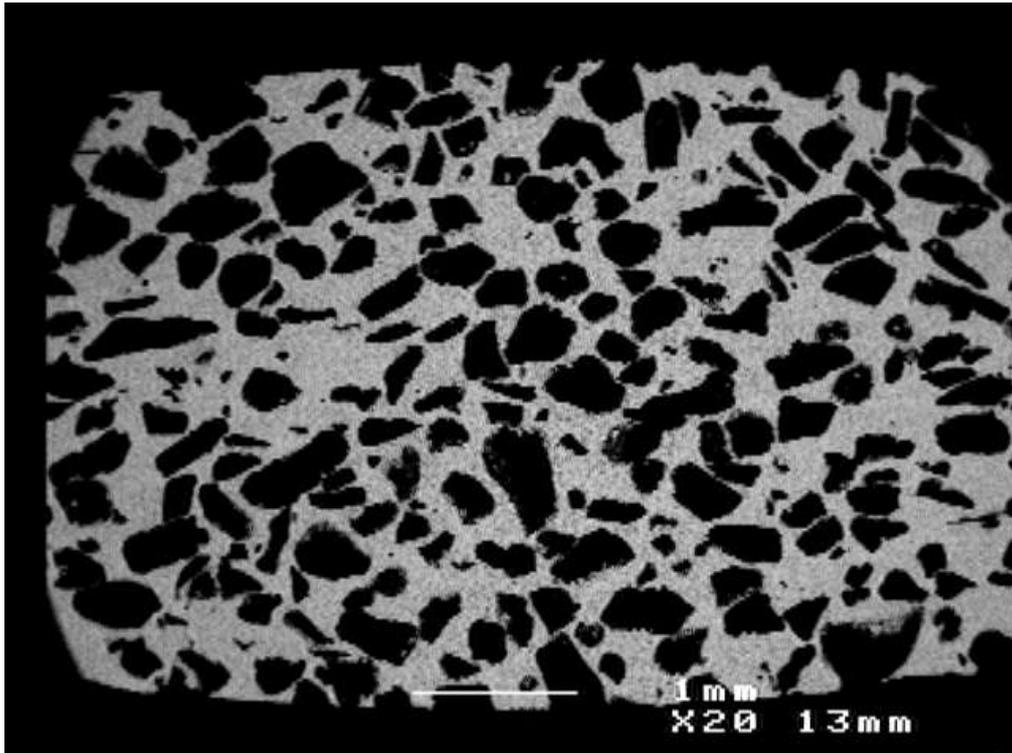


Figure 19 : Céramique JMB 4 - Image MEB

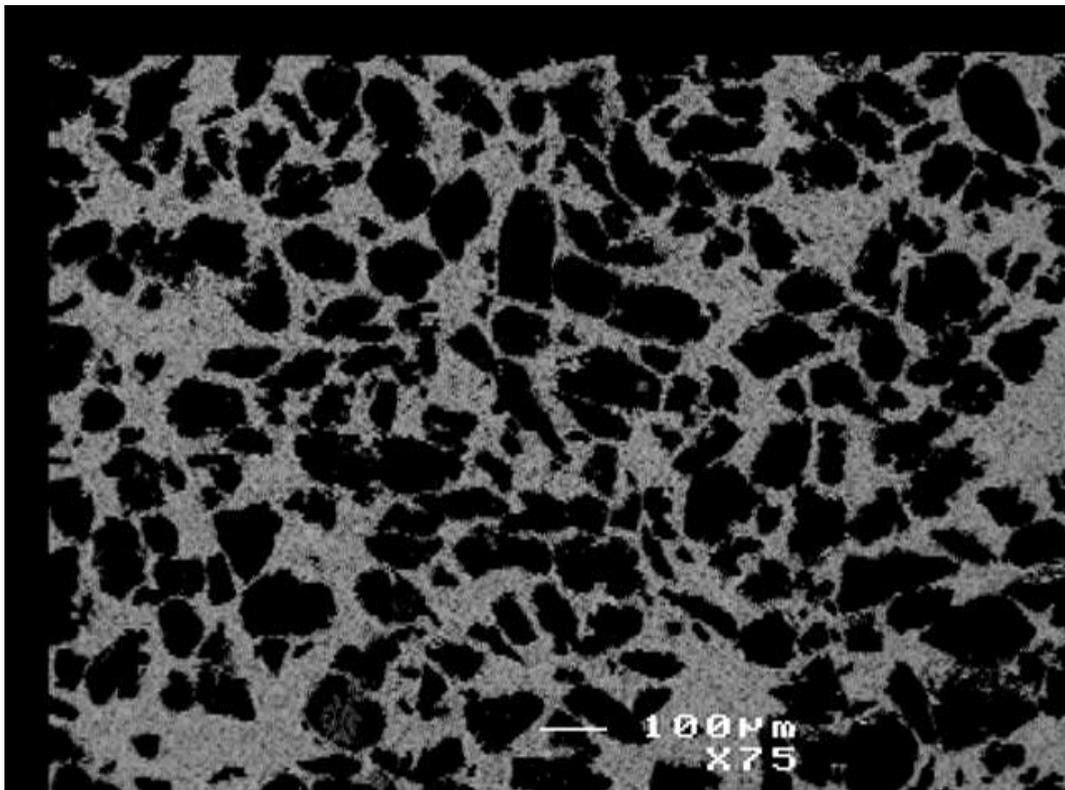


Figure 20 : Céramique JMB 5 - Image MEB

1.2- Conclusion :

L'interconnexion des BCP apparaît comme un paramètre difficilement quantifiable sauf à utiliser une modélisation mathématique de la porosité.

A la définition mathématique de l'interconnexion qui souffre d'une absence de signification physique, nous préférons les termes de *perméabilité* et de *tortuosité* des trajets poreux, deux paramètres facilement mesurables qui sont caractéristiques d'un réseau poreux interconnecté.

Nous avons développé des techniques de mesure adaptées aux BCP et suffisamment discriminantes pour permettre la comparaison de céramiques. Ces paramètres que nous sommes désormais capables de mesurer grâce aux méthodes mises au point nous ont en effet permis de différencier deux céramiques qui se distinguent essentiellement par la nature du porogène utilisé lors de leur fabrication

2 - Application des techniques d'étude de la porosité interconnectée aux principales céramiques biphasées disponibles sur le marché Français

Si les méthodes d'analyse précédemment mises au point ont permis de mettre en évidence d'importantes différences de perméabilité entre deux types de céramiques phosphocalciques biphasées, nulle information n'est fournie en revanche sur la robustesse et « l'universalité » des techniques employées. Il est donc apparu pertinent de mettre en œuvre cette méthodologie d'étude de l'architecture poreuse interconnectée sur un large panel de céramiques commercialisées sur la marché français afin de conclure quant au caractère pertinent et discriminant des techniques d'analyses employées.

2.1- Matériels et méthodes :

2.1.1- échantillons de céramiques phosphocalciques biphasées :

Au total sept céramiques phosphocalciques biphasées commercialisées sur le marché français ont été testées. Seules les céramiques sous forme de blocs ont été analysées en raison de l'incapacité des techniques de mesure employées à traiter des échantillons de petites tailles (granules de BCP par exemple).

Les biomatériaux sont constitués par une association d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique bêta selon une composition voisine de 60% d'HA pour 40% de β TCP.

Les tableaux 5 et 6 présentent les principales caractéristiques techniques des BCP étudiés dont la composition chimique des implants (% relatif en HA et β TCP) et les caractéristiques de porosité annoncées par le fabricant.

Nom Commercial	Fabricant	Dimensions des blocs de BCP	N° lot testé	Composition annoncée (% HA / % β TCP)
BCP Sofamor®	SOFAMOR DANEK	Blocs 5x5x20 mm	80S/99251 et Px2/9903	60/40
BCP Bicalphos®	MEDTRONIC SOFAMOR DANEK	Blocs 5x5x20 mm	G04165	60/40
BICERAM®	SBM	Blocs 5x5x20 mm	201001	60/40
CBC Ceraver ®	CERAVER OSTEAL	Blocs 5x5x20 mm	960699	65/35
EUROCER 200®	BIOLAND	Bloc 10x10x40 mm	80/0130	65/35
PHYSIO 6®	SBM	Blocs 5x5x20 mm	201208	60/40
TRIOSITE®	BIOMATLANTE	Blocs 5x5x20 mm	0602	60/40

Tableau 5 : Tableau des dimensions, numéros de lots et compositions chimiques des BCP testés (96)

Nom Commercial	Porosité annoncée par le fabricant	Techniques de mesure de la porosité
BCP Sofamor®	60-80 %	Analyse d'image en microscopie électronique
BCP Bicalphos®	70-90 %	Densité apparente
BICERAM®	50 %	Porosimétrie à mercure et densité apparente
CBC CERAVER®	45 %	Non Connue
EUROCER 200®	60 %	Non Connue
PHYSIO 6®	50 %	Porosimétrie à mercure et densité apparente
TRIOSITE®	65-75 %	Non Connue

Tableau 6 : Tableau des caractéristiques de porosité données par les fabricants des BCP testés

2.1.2- Méthodes d'analyse :

L'ensemble des techniques de mesures développées précédemment ont été utilisées pour caractériser les céramiques disponibles sur le marché.

Il a été choisi de compléter l'étude de la porosité par la mesure de la porosité « totale » pour s'affranchir des limites de la technique par porosimétrie à mercure en utilisant la Pycnométrie à hélium.

La pycnométrie est une technique d'analyse qui permet de calculer la densité apparente d'un matériau poreux ou d'une poudre à partir du volume d'intrusion d'un fluide (acétone, hélium, eau) pénétrant dans les pores du matériau. Le principe de la mesure de la porosité d'un échantillon poreux par pycnométrie repose sur une extrapolation de la norme NF C 26400 (122) relative à la détermination de la densité apparente de matériaux poreux. Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour la détermination de la porosité d'échantillons de céramiques phosphocalciques biphasées par BERUTO (15) :

Connaissant le volume géométrique du matériau, la mesure du volume d'intrusion d'un fluide au cœur de l'échantillon permet de calculer la porosité selon la formule :

$$\text{Porosité (\%)} = \frac{\text{Volume de fluide ayant pénétré dans le matériau}}{\text{Volume géométrique du matériau}}$$

Dans un premier temps, l'échantillon est placé sous microscope optique (Leica MZ6) et l'image est numérisée (caméra Kappa), enregistrée puis transférée sur un poste d'analyse d'images (PC Leica Q500 MC) où elle est filtrée et analysée pour en tirer des données quantitatives. Le calcul des longueurs des arêtes du bloc de BCP est réalisé avec une précision correspondant au pixel de l'image numérisée soit environ 12 μm et permet le calcul du *volume géométrique* de l'échantillon (produit des arêtes selon les axes x, y et z).

Dans un deuxième temps la céramique est analysée à l'aide d'un pycnomètre à hélium (AccuPyc 1330, Micromeritics) et l'on mesure le volume d'hélium ayant pénétré au cœur de chaque échantillon.

Chaque mesure a été répétée 10 fois. La valeur du volume d'intrusion correspond donc à la moyenne des 10 mesures.

3- Résultats des paramètres de porosité des céramiques phosphocalciques biphasées commercialisées sur le marché Français

3.1- Mesure de la perméabilité (perméamètre à pression constante)

Le nombre de Reynolds correspondant au débit maximal observé pour chaque type de céramique est présenté dans le tableau 7.

Nom de la céramique	Débit maximal observé (m³ / s)	Nombre de Reynolds associé (sans unité)
BCP Sofamor®	1.70.10 ⁻⁷	1.9.10 ⁻¹
BCP Bicalphos®	4.23.10 ⁻⁷	4.7.10 ⁻¹
BICERAM®	6.34.10 ⁻⁹	7.1.10 ⁻³
CBC CEREVER®	2.12.10 ⁻¹⁰	2.4.10 ⁻⁴
EUROCER®	1.02.10 ⁻⁷	1.1.10 ⁻¹
PHYSIO 6®	8.94.10 ⁻⁹	1.0.10 ⁻²
TRIOSITE®	1.44.10 ⁻¹⁰	1.6.10 ⁻⁴

Tableau 7 : Tableau des débits maximaux observés pour chaque céramique et nombre de Reynolds correspondant.

Les valeurs du nombre de Reynolds sont toutes inférieures à 1 ce qui traduit un écoulement de nature laminaire de l'eau circulant au sein de l'échantillon. Il est donc légitime d'appliquer la loi de Darcy quelle que soit la céramique.

Le tableau 8 présente les valeurs moyennes (n=6) des débits et perméabilités calculées pour chaque type de céramique.

Céramique	Perméabilité (m ²) ± Ecart type réduit
BCP Sofamor®	$4.23.10^{-12} \pm 9.1.10^{-13}$
BCP Bicalphos®	$9.81. 10^{-12} \pm 2.6.10^{-12}$
BICERAM®	$1.55.10^{-13} \pm 9.0.10^{-14}$
CBC CERAVER®	$5.16.10^{-15} \pm 1.0.10^{-15}$
EUROCER 200®	$3.03.10^{-12} \pm 2.4.10^{-13}$
PHYSIO 6®	$2.04.10^{-13} \pm 4.9.10^{-14}$
TRIOSITE®	$4.32.10^{-15} \pm 2.1.10^{-16}$

Tableau 8 : Tableau des perméabilités des sept céramiques phosphocalciques biphasées étudiées.

Ces résultats traduisent d'importantes différences de perméabilité entre les céramiques : les valeurs de ce paramètre d'interconnexion variant de 10^{-12} m² pour les BCP les plus perméables jusqu'à 10^{-15} m² pour les moins perméables.

Les perméabilités observées varient entre 9810.10^{-15} m² (BCP Bicalphos®) et $4.32.10^{-15}$ m² (TRIOSITE®) soit une variation d'un facteur 2000 environ entre la perméabilité la plus élevée et la perméabilité la plus faible (tableau 5).

3.2- Détermination du facteur de tortuosité :

Après une période initiale d'instauration du phénomène de diffusion (figure 9), la vitesse de passage des ions iodures dans le deuxième compartiment est constante. La cinétique d'apparition du traceur devient linéaire ($98.8\% < r^2 < 99.8\%$).

L'annexe 6 présente une des cinétiques de diffusion pour chacune des 7 céramiques étudiées ainsi que les équations des courbes de diffusion et les coefficients de diffusion expérimentaux.

Par ailleurs, le tableau 9 fournit les valeurs moyennes des coefficients de tortuosité observées pour les 7 céramiques testées.

Céramique	Facteur de tortuosité \pm écart type réduit (sans unité)
BCP Sofamor®	2.8 \pm 1.5
BCP Bicalphos®	3.5 \pm 1.7
BICERAM®	15.3 \pm 2.1
CBC Ceraver®	44.6 \pm 8.2
EUROCER®	20.0 \pm 4.7
PHYSIO 6®	96.0 \pm 21.4
TRIOSITE®	19.1 \pm 4.8

Tableau 9 : Tableau des valeurs moyennes des coefficients de tortuosité des 7 BCP étudiés

Les importantes différences de tortuosité d'un BCP à l'autre apparaissent encore plus clairement si les résultats sont présentés sous la forme d'un diagramme (figure 21) :

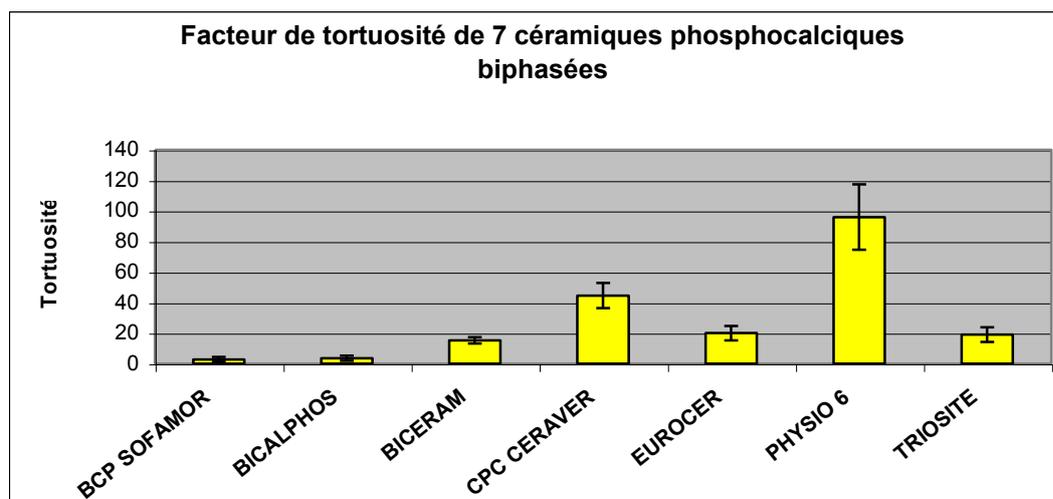


Figure 21 : Etude comparée des facteurs de tortuosité des 7 céramiques phosphocalciques biphasées testées

Les expériences de diffusion menées pour déterminer la tortuosité de nos échantillons impliquaient son immersion prolongée (48 à 57 heures). Pour étudier l'éventuelle modification de l'interconnexion durant cette période (par dissolution de la matrice phosphocalcique), les perméabilités « avant » et « après immersion » dans la cuve de diffusion ont été déterminées pour chaque échantillon.

Une comparaison des moyennes de deux séries appariées de faible effectif (mesure de la perméabilité avant et après expérience de diffusion des iodures) est menée pour chaque BCP.

La comparaison des deux moyennes permet le calcul d'un t expérimental dont la valeur est supérieure au $t_{\text{limite}} = 4,303$ (2ddl, $\alpha = 5\%$).

Les augmentations de perméabilité relevées sont de + 1.8% (CBC Ceraver) à + 3.4% (BCP Bicalphos) et l'on conclut à une différence non significative entre les perméabilités avant et après immersion dans la cuve de diffusion.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus aux valeurs connues de la tortuosité pour l'os trabéculaire de l'ordre de 2 à 3 (9), (120).

D'un point de vue physique, la tortuosité traduit la longueur du trajet effectué par une particule au travers du réseau poreux interconnecté. Plus exactement il s'agit du carré du rapport entre le trajet effectué par une particule au travers du pore sur la longueur de ce même trajet projeté sur un axe. La conséquence de cette définition est qu'une particule empruntant le réseau poreux interconnecté du PHYSIO 6® (tortuosité = 96,0) suit un trajet 5,8 fois plus long que si cette même particule avait emprunté le réseau poreux du même BCP Sofamor® (tortuosité = 2,8).

En l'état actuel des connaissances on ne connaît pas l'intérêt du facteur de tortuosité sur la cinétique de dégradation de l'implant ou la néoformation osseuse. On peut néanmoins imaginer que la tortuosité puisse influencer sur les propriétés d'ostéconduction de la céramique et notamment la cinétique de pénétration cellulaire puisque le trajet effectué par une particule (une cellule) peut être sensiblement plus long d'une céramique à l'autre. La tortuosité, tout comme la perméabilité pourrait donc quantifier la « facilité d'accès » offerte par la céramique aux cellules et tissus qui pénètrent à l'intérieur.

3.3- Résultats de l'étude de la porosité des BCP

3.3.1- Porosité de l'échantillon déterminée par porosimétrie à mercure

Les valeurs moyennes des porosités déterminées par porosimétrie à mercure sont données dans le tableau 10 et figure 22 :

Céramique	Porosité (%) ± écart type réduit
BCP Sofamor®	48.6 ± 8.1
BCP Bicalphos®	68.0 ± 14.4
BICERAM®	34.1 ± 6.4
CBC Ceraver®	46 ± 5.4
EUROCER 200®	47.3 ± 4.8
PHYSIO 6®	39.1 ± 3.9
TRIOSITE®	64.4 ± 9.4

Tableau 10 : Tableau des valeurs des pourcentages de porosité déterminés par porosimétrie à mercure

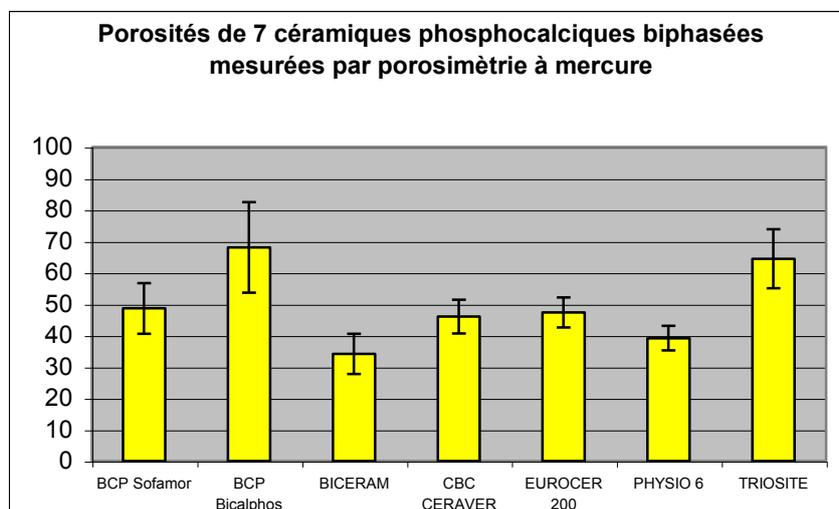


Figure 22 : Diagramme des valeurs de porosité des 7 céramiques étudiées - Technique par porosimétrie à mercure

Les valeurs moyennes des porosités varient de 34.1% à 68.0 % selon le BCP considéré. Néanmoins l'écart type élevé observé sur ce paramètre fait que cinq céramiques (BCP Sofamor®, BICERAM®, CBC Ceraver®, EUROCER 200® et PHYSIO 6®) sur les sept

étudiées ne présentent pas de différence de porosité significative entre elles ($p < 0.01$). Leur porosité moyenne se situe aux environs de 40 / 45 %.

Seuls la TRIOSITE® et le BCP Bicalphos® présentent une valeur de porosité significativement supérieure aux autres céramiques avec respectivement 64.4 et 68% de porosité. En revanche les porosités de la TRIOSITE® et du BCP Sofamor® ne sont pas significativement différentes ($p < 0.01$).

3.3.2- Porosité de l'échantillon déterminée par pycnométrie à hélium

Les résultats de porosité fournis par cette technique de mesure impliquant un pycnomètre à hélium sont présentés dans le tableau 11 :

Céramique	Porosité (%)
BCP Sofamor®	51.3 %
BCP Bicalphos®	76.9 %
BICERAM®	41.1 %
CBC Ceraver®	43.2 %
EUROCER 200®	45.2 %
PHYSIO 6®	43.2 %
TRIOSITE®	68.8 %

Tableau 11 : Tableau des pourcentages de porosité de 7 céramiques phosphocalciques biphasées - Technique par pycnométrie à hélium

Les valeurs de porosité fournies par pycnométrie à hélium sont généralement faiblement supérieures à celles relevées par porosimétrie à mercure (sauf pour le CBC Ceraver® et l'EUROCER 200®). On observe, tout comme par porosimétrie à mercure, un groupe de 5 BCP dont la porosité moyenne est sensiblement équivalente aux alentours de 45 %.

La TRIOSITE® et le BCP BICALPHOS® ont une porosité significativement supérieure à ce groupe de cinq BCP.

La comparaison des valeurs de porosité obtenues par porosimétrie à mercure (tableau 10) et pycnométrie à hélium (tableau 11) permet de dresser plusieurs constats :

- La pycnométrie à hélium semble donner des valeurs de porosité légèrement supérieures à la porosimétrie à mercure.
- Les valeurs obtenues par ces deux techniques sont cependant assez comparables pour l'ensemble des céramiques testées.
- Les résultats doivent être nuancés par le fait que les mesures de pycnométrie ne portaient que sur un seul échantillon pour chacune des sept céramiques.

Beruto (15) attribue cette différence entre les porosités fournies par ces deux techniques de mesure à la *porosité occluse* de l'échantillon, c'est à dire aux pores *totalelement inaccessibles au mercure*. Cette conclusion est cependant incomplète car trois phénomènes sont susceptibles d'expliquer cette (relative) différence entre les valeurs fournies par porosimétrie à mercure et celles données par pycnométrie à hélium.

- La non prise en compte de certains macropores de grands diamètres par porosimétrie à mercure, ce qui est le cas pour le BCP Sofamor® qui a des diamètres de pores moyens mesurés par Analyse d'image en MEB de l'ordre de 500 μm (116), (146).
- La non prise en compte de nanopores de diamètre inférieur à 10 nanomètres imposée par la technique de porosimétrie à mercure.
- L'impossibilité de pénétration du mercure dans les pores occlus, structures totalement déconnectées du réseau poreux et inaccessibles même au mercure sous pression. L'Hélium, conséquence du faible encombrement de sa molécule, peut dans une certaine mesure pénétrer dans certains de ces pores.

3.3.3- Etude de la répartition de la porosité en classes de pores par porosimétrie à mercure

La proportion relative en macropores, mésopores et micropores peut être fournie par porosimétrie à mercure. Le tableau 12 présente la répartition de chacune de ces classes de pores selon la méthodologie décrite au point 3.2.3.1.

Certaines céramiques apparaissent essentiellement macroporeuse (BCP Sofamor®, BCP Bicalphos® et EURO CER 200®). D'autres BCP possèdent un profil de porosité mixte, à la fois macro, méso et microporeux (BICERAM®, PHYSIO 6®, TRIOSITE®). Enfin une céramique présente une porosité essentiellement formée de micropores (CBC Ceraver®).

Céramique	Proportion relative des macropores <i>(en % de la porosité totale)</i>	Proportion relative des mésopores <i>(en % de la porosité totale)</i>	Proportion relative des micropores <i>(en % de la porosité totale)</i>
BCP Sofamor®	57.2%	8.4%	34.4%
BCP Bicalphos®	69.9%	6.6%	23.5%
BICERAM®	16.4%	23.1%	60.5%
CERAVER®	3.7%	2.8%	93.5%
EURO CER 200®	59.9%	4.7%	35.4%
PHYSIO 6®	10.9%	24.4%	64.7%
TRIOSITE®	13.4%	27.1%	59.5%

Tableau 12 : Tableau des proportions relatives en macropores, mésopores, micropores des 7 BCP étudiés – technique par porosimétrie à mercure

3.3.4- Etude des paramètres d'interconnexion à l'aide du logiciel Pore Cor® : Analyse des courbes d'intrusion de mercure

Les courbes d'intrusion de mercure pour les céramiques étudiées présentent différents aspects fonction de leur nombre de points d'inflexion :

Courbes d'intrusion possédant un point d'inflexion

Le CBC Ceraver® présente une courbe d'intrusion de mercure avec un seul point d'inflexion (figure 23).

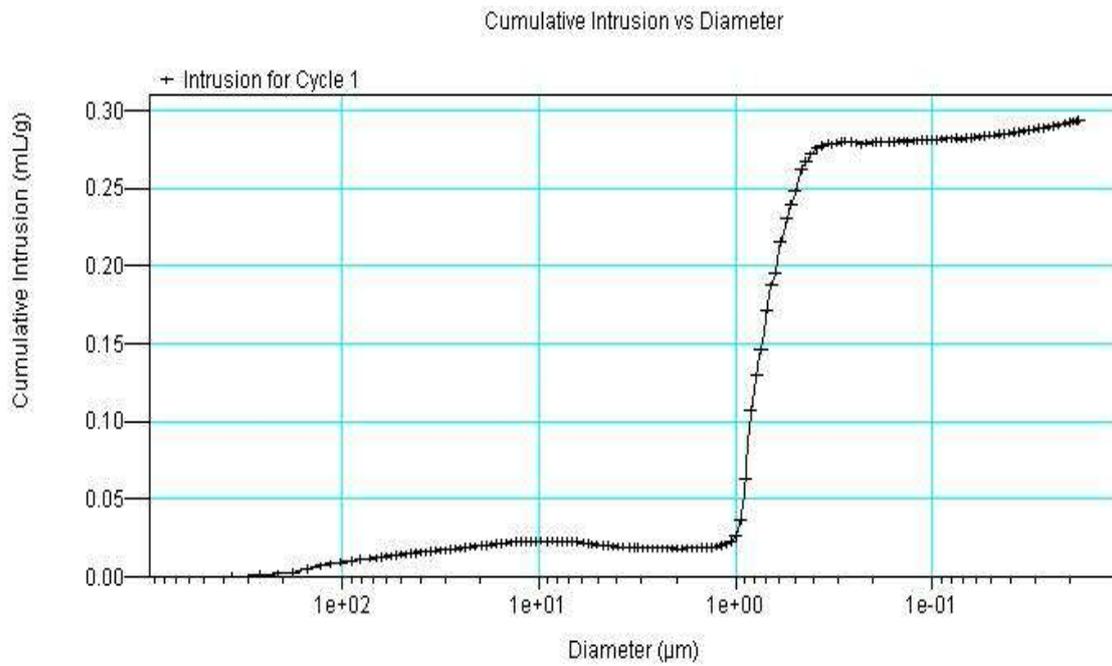


Figure 23 : Courbe d'intrusion de mercure du CBC Ceraver®

Courbes d'intrusion possédant deux points d'inflexion :

Le BCP Bicalphos® (figure 24), le PHYSIO 6® (figure 25), l'EUROCER 200® (figure 26) et la TRIOSITE® (figure 27) présentent deux points d'inflexion de leurs courbes d'intrusion de mercure. Certains tracés obtenus pour l'EUROCER 200® laissent percevoir un 3ème point d'inflexion mais étant donné la faible différence de plateau observée de part et d'autre de ce 3^{ème} point, il a été décidé de ne pas en tenir compte. D'autre part, toutes les courbes obtenues pour la TRIOSITE® présentent le même aspect avec un point d'inflexion très net pour des diamètres d'intrusion compris entre 0.1 et 1 micromètres. Un deuxième point d'inflexion est signalé par le logiciel Pore Cor® pour des diamètres d'intrusion compris entre 15 et 20 µm.

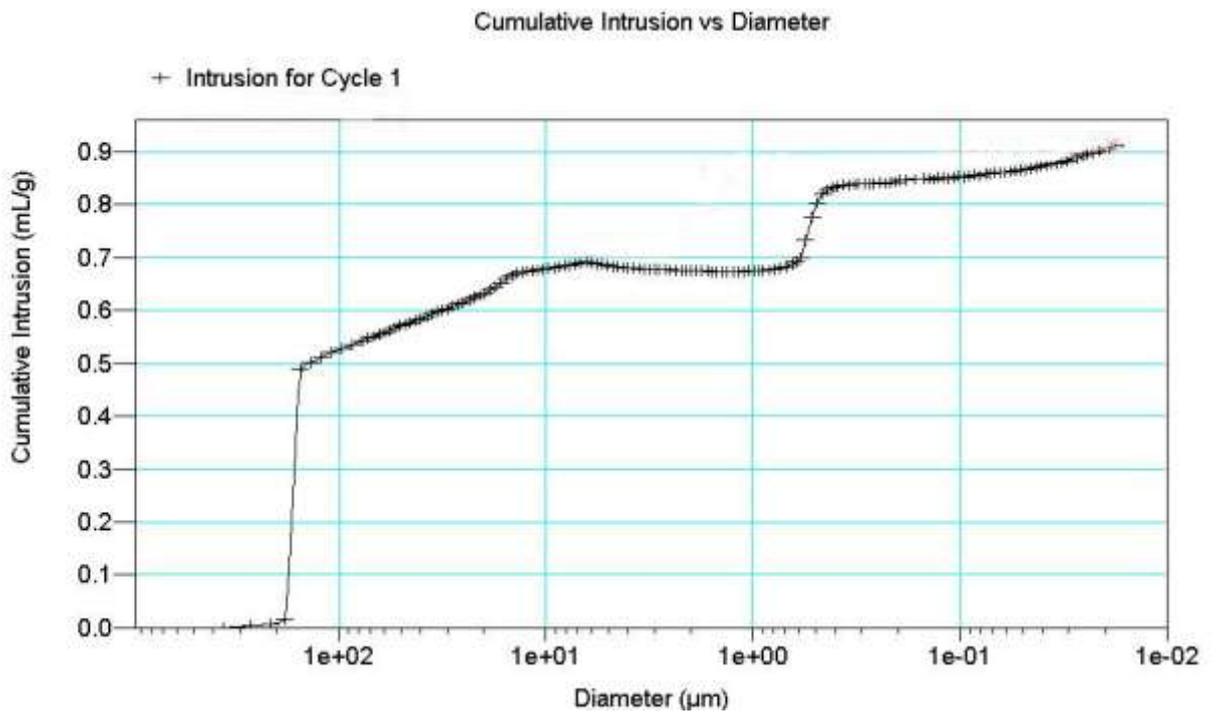


Figure 24 : Courbe d'intrusion de mercure du BCP Bicalphos®

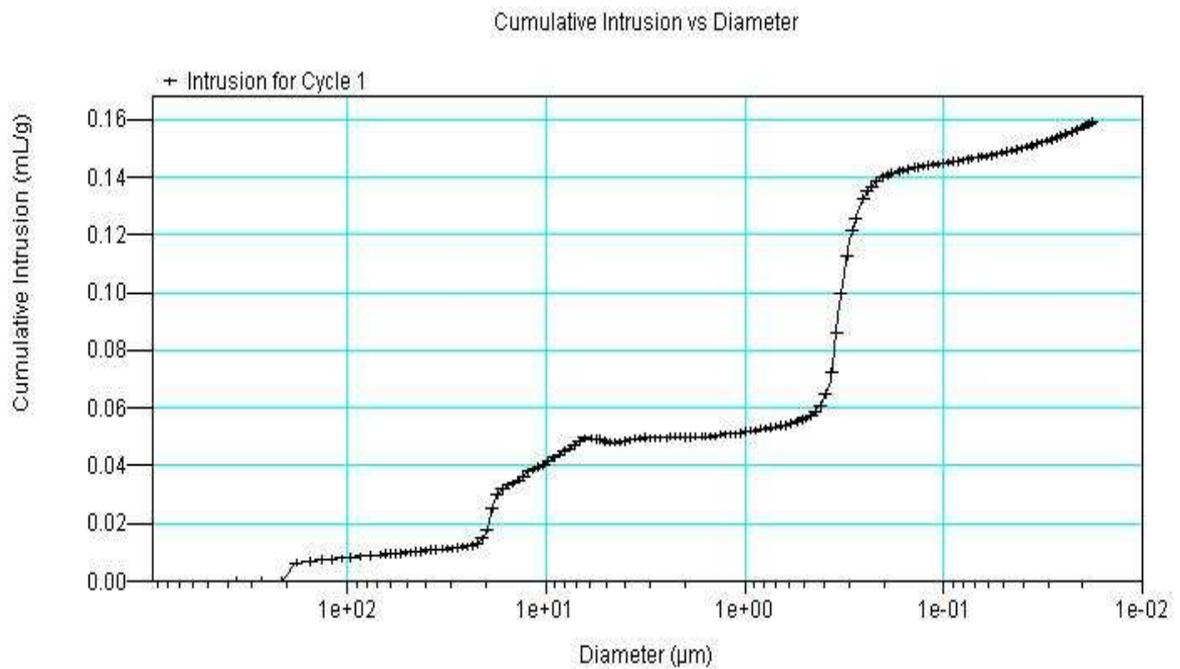


Figure 25 : Courbe d'intrusion de mercure du PHYSIO 6®

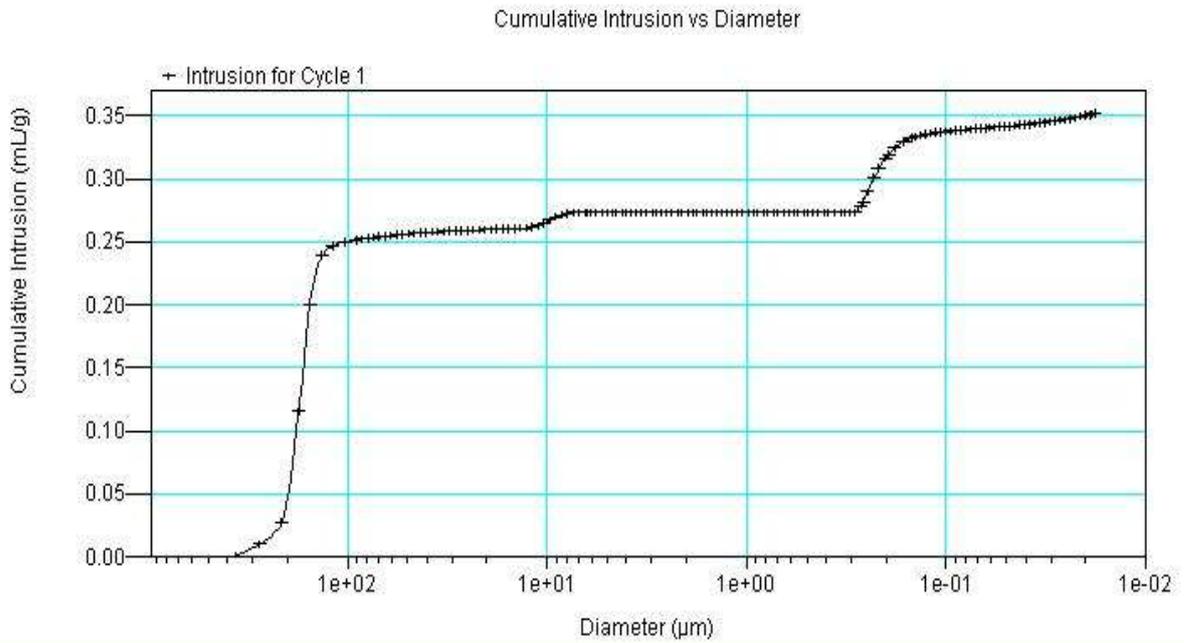


Figure 26 : Courbe d'intrusion de mercure de l'EURO CER 200®

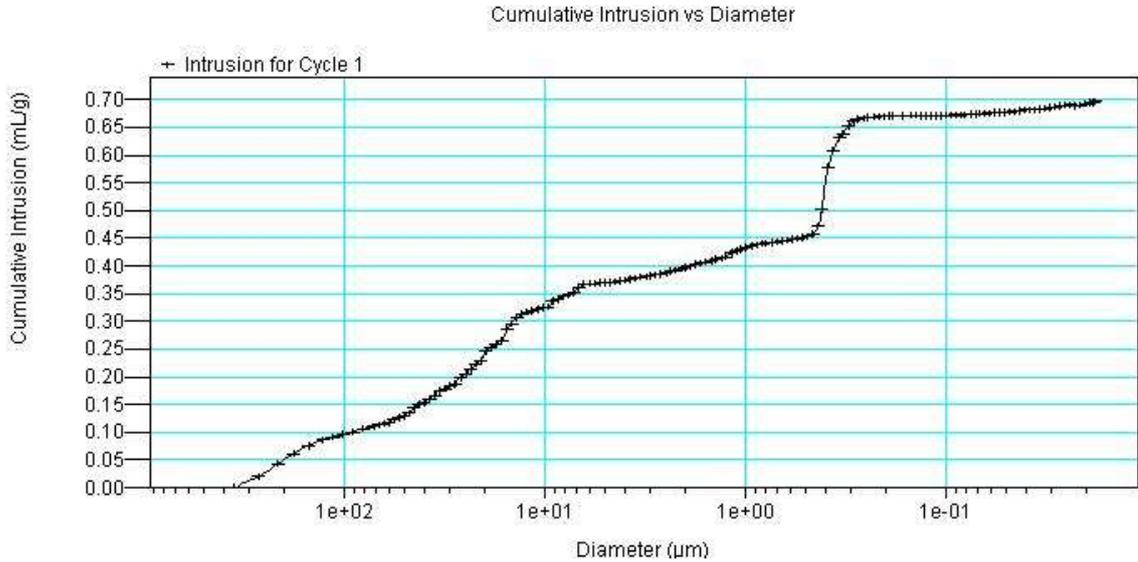


Figure 27 : Courbe d'intrusion de mercure de la TRIOSITE®

Courbes d'intrusion possédant trois points d'inflexion

Le BCP Sofamor® (figure 28) et le BICERAM® (figure 29) présentent trois points d'inflexion de leur courbes d'intrusion de mercure.

3.3.5- Analyse des perméabilités et diamètres des canaux d'interconnexion (D_{50}) fournis par le logiciel Pore Cor

La présence sur la courbe d'intrusion de mercure d'une à trois parties en fonction du nombre de points d'inflexion définit autant de perméabilités, de tortuosités et de D_{50} différents pour une céramique donnée.

Le tableau 13 présente les valeurs des perméabilités fractionnées conjointement aux diamètres des canaux d'interconnexion (D_{50}) à l'origine du phénomène de perméabilité. Les perméabilités sont données en milliDarcies (mD) par le logiciel Pore Cor® (1 Darcy = $0,97.10^{-12}$ m²).

Perméabilité [mD] (Diamètre des canaux d'interconnexion impliqués =D_{50})	BCP Sofamor	BCP Bicalphos	BICERAM	CBC Ceraver	EUROCER 200	PHYSIO 6	TRIOSITE
Perméabilité due à des macropores	$2.75.10^5$ (176 μ m)	$7.58.10^5$ (155 μ m)	$2.29.10^5$ (185 μ m)	0	$3.93.10^6$ (161 μ m)	0	0
Perméabilité due à des mésopores	$1.08.10^2$ (11.9 μ m)	0	$8.16.10^2$ (16.1 μ m)	0	0	$2.84.10^1$ (18.5 μ m)	6.10^1 (18.5 μ m)
Perméabilité due à des micropores	$4.24.10^{-2}$ (0.22 μ m)	$3.0.10^{-2}$ (0.50 μ m)	$5.64.10^{-2}$ (0.30 μ m)	$2.90.10^{-3}$ (0.76 μ m)	$2.64.10^{-2}$ (0.34 μ m)	$3.4.10^{-1}$ (0.31 μ m)	1.10^0 (0.37 μ m)
Perméabilité totale	$2.75.10^5$	$7.58.10^5$	$2.29.10^5$	$2.90.10^{-3}$	$3.93.10^6$	$2.87.10^1$	$6.1.10^1$

Tableau 13 : Tableau des perméabilités fractionnées et diamètres des canaux d'interconnexion responsables de la perméabilité

La comparaison entre les valeurs de perméabilité et les diamètres de pores d'interconnexion est révélatrice : ce sont les pores d'interconnexion de grand diamètre qui sont à l'origine des plus fortes perméabilités.

La perméabilité élevée observée dans le premier groupe de BCP est donc liée à un phénomène d'interconnexion assuré par des macropores.

Une perméabilité plus faible est due à une interconnexion sous la forme de canaux mésoporeux ou à l'extrême, microporeux comme dans le cas du CBC Ceraver®.

L'analyse conjointe de la porosité (tableau 8) et de la perméabilité (tableau 10) confirme un constat déjà effectué lors de travaux précédents (97) : la porosité n'est pas prédictive de la perméabilité de la céramique. A l'appui de cette observation, le BICERAM® qui a une perméabilité de $2.29 \cdot 10^5$ MilliDarcies contre 28.7 MilliDarcies pour le PHYSIO 6® alors que leurs porosités déterminées par pycnométrie à hélium sont comparables. D'autre part, la répartition en macro/mésopores et micropores est assez similaire pour ces deux céramiques.

3.3.6- Calcul des facteurs de tortuosité à l'aide du logiciel Pore Cor®

Nous observons que dans de nombreux cas, le logiciel de modélisation des volumes poreux rencontre des difficultés à calculer les facteurs de tortuosité pour les échantillons de céramiques : un message d'erreur est apparu pour plusieurs calculs de tortuosité émettant des réserves quant à l'exactitude du résultat. Le principe de la mesure du facteur de tortuosité repose sur le trajet géométrique fictif d'une particule traversant la modélisation 3D fournie par Pore Cor®. Si la porosité est insuffisamment interconnectée, la particule peut être « bloquée » et ne pas traverser la modélisation de la céramique. La mesure de la tortuosité reposant sur la moyenne de 100 trajets virtuels, au delà d'un certain nombre d'échecs, le calcul de la tortuosité devient impossible car non significatif d'un point de vue statistique.

3.3.7- Modélisation des volumes poreux à l'aide du logiciel Pore Cor®

Les représentations des sept céramiques sont données par les figures 30 à 36.

Le BCP Sofamor® :

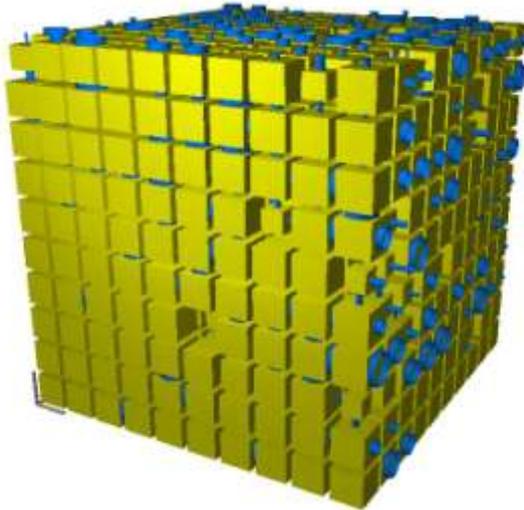


Figure 30 : représentation Pore Cor® du BCP Sofamor®

Le BCP Bicalphos® :

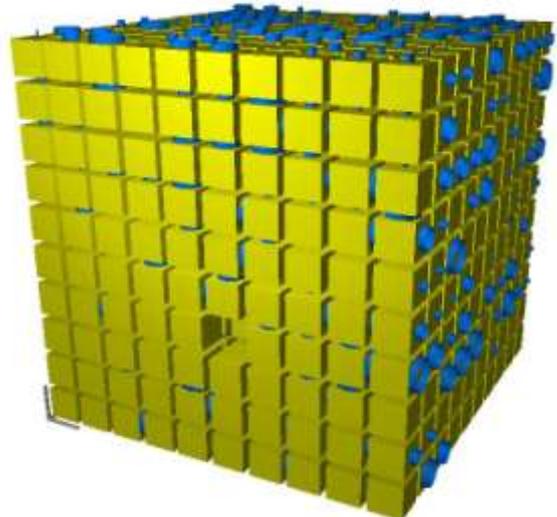


Figure 31 : représentation Pore Cor® du BCP Bicalphos®

Le BICERAM® :

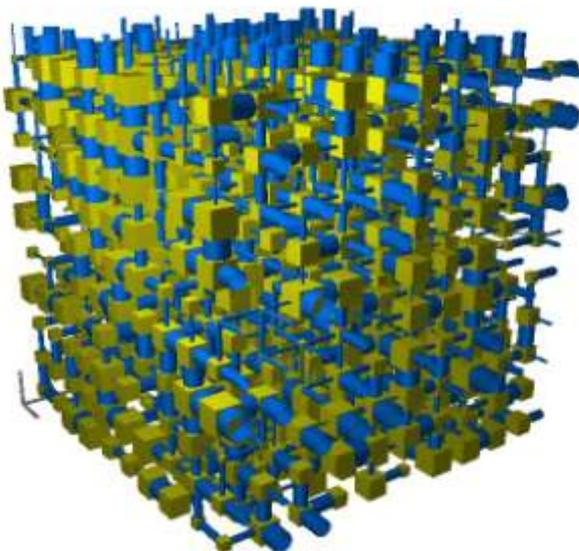


Figure 32 : représentation Pore Cor® du BICERAM®

Le CBC Ceraver® :

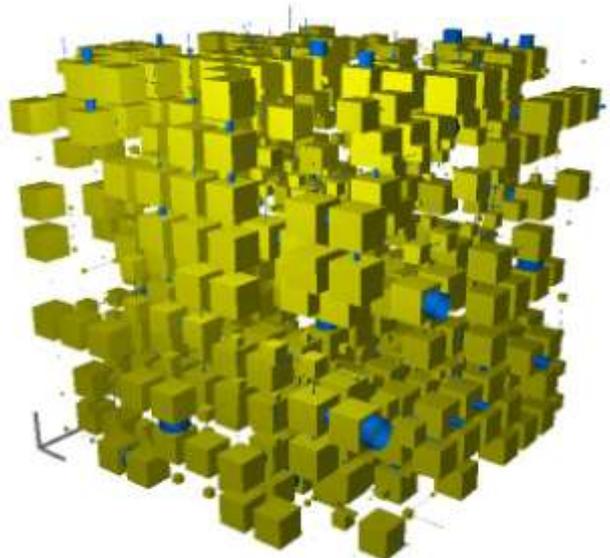


Figure 33 : représentation Pore Cor® du CBC Ceraver®

L'EUROCER 200® :

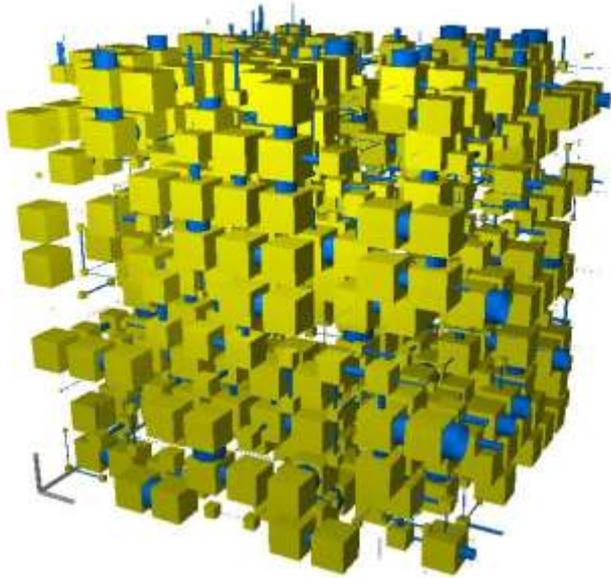


Figure 34 : représentation Pore Cor® de l'EUROCER 200®

Le PHYSIO 6® :

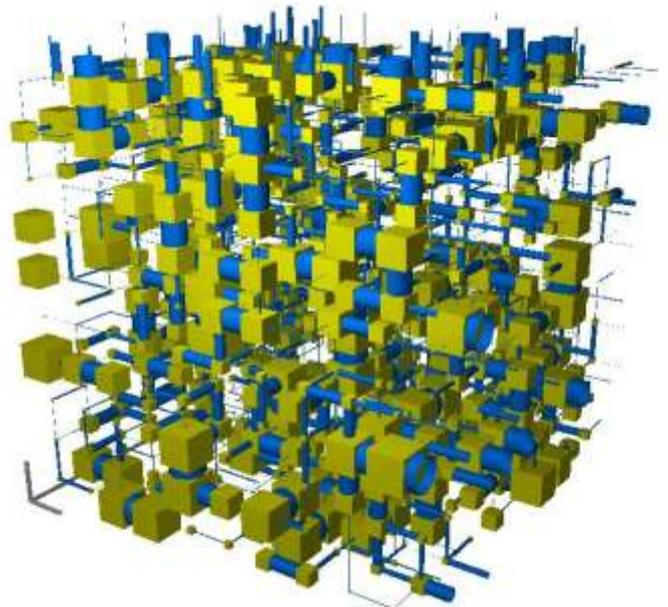


Figure 35 : représentation Pore Cor® du PHYSIO 6®

La TRIOSITE® :

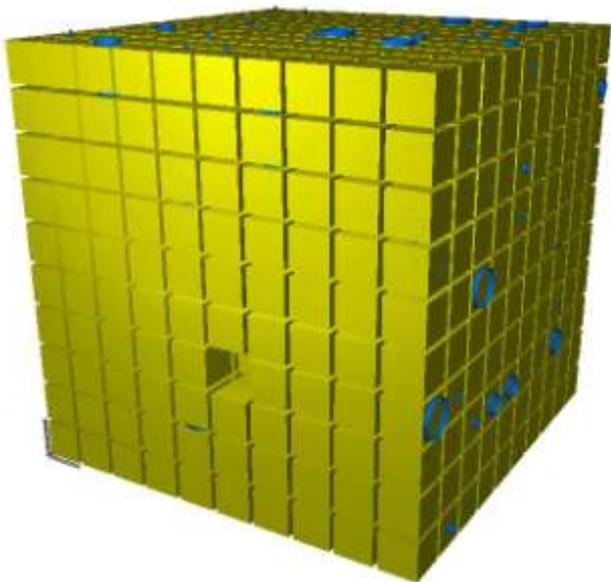


Figure 36 : représentation Pore Cor® de la TRIOSITE®

les résultats obtenus font apparaître 4 types de représentations fonction de la porosité de l'échantillon et du degré d'interconnexion de la porosité.

- Le premier type est figuré par les BCP poreux dotés d'une perméabilité élevée (BCP Sofamor® ou le BCP Bicalphos®).

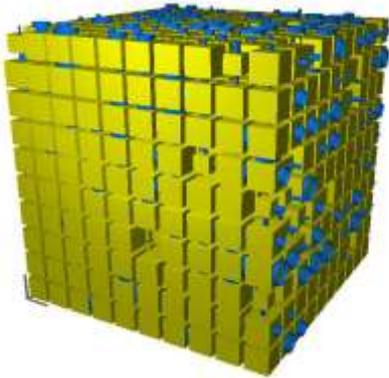


Figure 37 : Représentation Pore Cor® du BCP Sofamor®

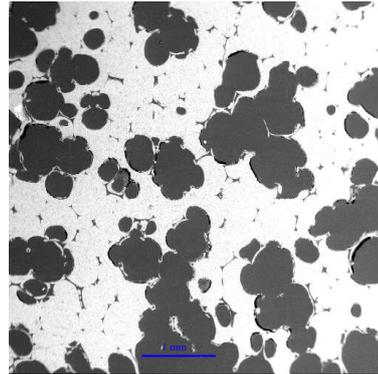


Figure 38 : Photo du BCP Sofamor® prise au MEB (x20)

Une comparaison réalisée entre la modélisation informatique du BCP Sofamor® et les images acquises par MEB permet de vérifier une excellente corrélation entre ces deux méthodes d'étude.

L'importante porosité prévue par le logiciel est vérifiée sur les images MEB par la présence de nombreux macropores fortement connectés les uns aux autres, signe d'une forte perméabilité par ailleurs prévue par le logiciel.

- Le deuxième type est représenté par les BCP poreux possédant une perméabilité moyenne à faible (TRIOSITE®) :

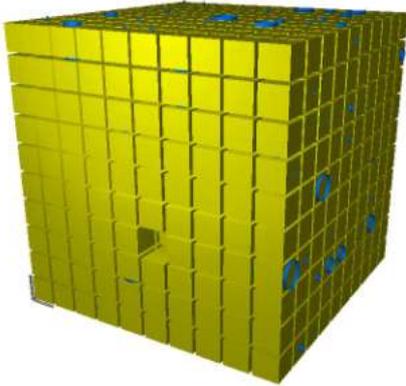


Figure 39 : Représentation Pore Cor® de la TRIOSITE

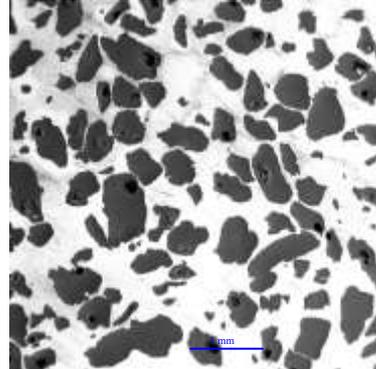


Figure 40 : Photo de la TRIOSITE prise au MEB (x20)

La corrélation entre la modélisation apportée par le logiciel et les images prises en MEB est excellente. De nombreux macropores plus ou moins isolés les uns des autres sont visibles confirmant la modélisation Pore Cor® qui présente de larges cellules poreuses (cubes jaunes) assez peu connectées les unes aux autres.

- Le troisième type est figuré par les BCP moyennement poreux et néanmoins perméables (BICERAM®, EUROCER 200®) :

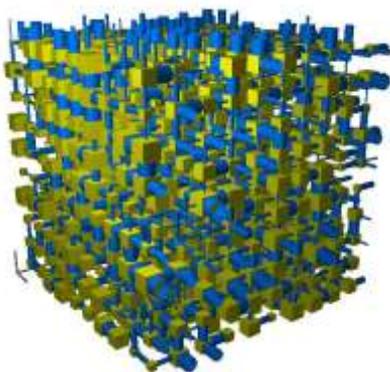


Figure 41 : Représentation Pore Cor® du BICERAM

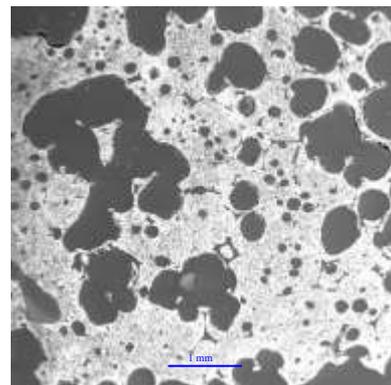


Figure 42 : Photo du BICERAM prise au MEB (x20)

On observe sur les photos du BICERAM® prises en MEB des macropores connectés les uns aux autres et réunis en petits groupes laissant supposer une forte perméabilité due à ce type de

pores. Comme pour les BCP précédents, la représentation fournie par le logiciel confirme les observations réalisées sur les images de microscopie électronique.

- Le dernier type de BCP comprend les céramiques moyennement poreuses et moyennement ou faiblement perméables (PHYSIO 6®, CBC CERAVER®) :

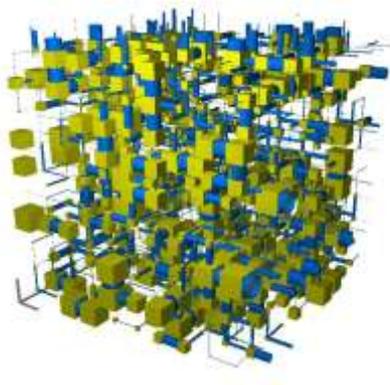


Figure 43 : Représentation Pore Cor® du PHYSIO 6

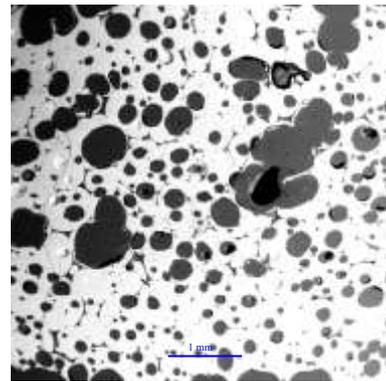


Figure 44 : Photos du PHYSIO 6 prise au MEB (x20)

Le niveau de porosité observé sur les images du PHYSIO 6® prises en microscopie électronique à balayage est plus faible que pour les échantillons précédents. Quelques macropores connectés les uns aux autres sont noyés dans la matrice phosphocalcique, elle même percée de mésopores non connectés entre eux. La porosité moyenne et la faible perméabilité prévues par le logiciel Pore Cor sont donc vérifiées sur les images prises en MEB.

3.4- Conclusion

L'étude comparée de la porosité interconnectée menée sur 7 BCP révèle une forte hétérogénéité des caractéristiques architecturales et d'interconnexion.

La perméabilité et la tortuosité, deux paramètres caractéristiques de l'interconnexion qui reflètent l'accessibilité des volumes poreux aux fluides biologiques, varient d'un facteur 1 à 2000 pour la perméabilité et de 1 à 60 pour la tortuosité fonction de la céramique étudiée.

En toute logique, l'interconnexion la plus performante est assurée par des pores de grand diamètre. La perméabilité due aux méso et micropores est nettement plus faible.

Il ne semble pas exister de corrélation systématique entre le niveau de porosité et le degré de perméabilité ou de tortuosité. En d'autres termes, une céramique poreuse n'est pas pour autant interconnectée.

Cette étude contribue donc à la meilleure connaissance de la structure poreuse de 7 substituts osseux par la mesure de leurs paramètres de porosité et d'interconnexion. Ces véritables critères de qualité « en devenir » sont résumés dans le tableau 14.

Ce travail valide ces nouveaux outils de détermination de la porosité interconnectée et pose les bases des études futures visant à déterminer le rôle exact de la porosité interconnectée et à mieux contrôler l'architecture poreuse des BCP.

Paramètre		Interconnexion			Porosité			
		Perméabilité (m^2)	Tortuosité	Diamètre canaux d'interconnexion (μm)	Porosité totale (% en valeur absolue)	% macro et mésopores (% en valeur absolue)	% micropores (% en valeur absolue)	% de macro/mésoporosité piégée (en % de la porosité totale)
Méthode d'étude		<i>Perméamètre à pression constante</i>	<i>Cuve de diffusion</i>	<i>Logiciel Pore Cor®</i>	<i>Pycnométrie à hélium</i>	<i>MEB</i>	<i>Analyse d'image + MEB</i>	<i>Analyse d'image + MEB</i>
Céramiques étudiées	BCP Sofamor®	$4,23.10^{-12} \pm 9,1.10^{-13}$	$2,8 \pm 1,5$	176 - 11,9 et 0,22 μm	51,3 %	35,4%	15,9%	3.4%
	BCP Bicalphos®	$9,81.10^{-12} \pm 2,6.10^{-12}$	$3,5 \pm 1,7$	155 et 0,50 μm	76,9 %	61,6%	15,3%	3.6%
	BICERAM®	$1,55.10^{-13} \pm 9,0.10^{-14}$	$15,3 \pm 2,1$	185 - 16,1 et 0,30 μm	41,1 %	31,9%	9,2%	38.1%
	CBC Ceraver®	$5,16.10^{-15} \pm 1,0.10^{-15}$	$44,6 \pm 8,2$	0,76 μm	43,2 %	9,4%	33,8%	15.3%
	EUROCER 200®	$3,03.10^{-12} \pm 2,4.10^{-13}$	$20,0 \pm 4,7$	161 et 0,34 μm	45,2 %	31,8%	13,4%	5.8%
	PHYSIO 6®	$2,04.10^{-13} \pm 4,9.10^{-14}$	$96,0 \pm 21,4$	18,5 et 0,31 μm	43,2 %	37,7%	5,5%	52.0%
	TRIOSITE®	$4,32.10^{-15} \pm 2,1.10^{-16}$	$19,1 \pm 4,8$	18,5 et 0,37 μm	68,8 %	46,1%	22,7%	26.5%

Tableau 14 : Résumé des caractéristiques de porosité et d'interconnexion des 7 céramiques étudiées

Partie 3 : identification et optimisation des paramètres de fabrication contrôlant l'architecture poreuse interconnectée

Malgré des qualités mécaniques moindres, les céramiques macroporeuses constituent presque exclusivement la génération actuelle de substituts osseux en raison notamment de propriétés biologiques supérieures. Leur macroporosité est l'élément déterminant de leur capacité d'ostéoconduction, en permettant une réhabilitation/substitution de l'implant.

Une des principales limites des céramiques est leur résistance mécanique parfois insuffisante et bon nombre de céramiques de la génération actuelle utilisées en sites non contraints mécaniquement font appel, conjointement à l'implantation du substitut osseux, à une ostéosynthèse « stable ». Cette utilisation dans des conditions « hors charge » limite les fractures au sein de l'implant et évite l'effondrement de la macroporosité. Les micro mouvements à l'interface os-implant, qui aboutissent à une encapsulation fibreuse de la céramique et à la formation d'une pseudarthrose (30), (39), (55) sont aussi fortement limités par la mise en place de l'ostéosynthèse.

Plusieurs études (14), (45) ont montré qu'il est possible d'améliorer, dans une certaine mesure les propriétés mécaniques des céramiques macroporeuses en diminuant le pourcentage de macropores et en augmentant le diamètre des macropores, les propriétés ostéoconductrices étant conservées. L'optimisation des céramiques phosphocalciques biphasées passe cependant par la recherche d'un équilibre entre des propriétés mécaniques élevées et une architecture poreuse fortement interconnectée. Les macropores devant rester accessibles aux cellules ostéogéniques pour assurer à terme un contact osseux étroit, le plus étendu possible, entre l'os receveur et le biomatériau (30), (31).

Les objectifs de cette seconde partie sont :

- d'identifier et de clarifier le rôle des principaux paramètres dictant de manière critique la structure poreuse interconnectée des céramiques phosphocalciques biphasées
- de proposer de nouvelles stratégies de création de la porosité interconnectée

1- Procédés de fabrication des céramiques phosphocalcique biphasée

La fabrication des céramiques phosphocalciques biphasées comprend trois étapes principales : *la préparation de la poudre* qui comprend notamment l'introduction d'un porogène par mélange à sec à une poudre de phosphate de calcium, *une mise en forme* suivi d'un *traitement thermique* qui permet l'élimination du porogène et la consolidation de la céramique.

1.1- Les composants de départ :

1.1.1- Préparation des poudres

1.1.1.1- Poudre de phosphate de calcium :

La poudre de phosphate est formée d'apatite déficiente en calcium qui peut être obtenue par précipitation (1), (2), (86), (92) en milieu aqueux de sels de calcium et d'ammonium ou par réaction hydrothermale (77), (78). De manière à pouvoir être manipulée et subir le traitement thermique, cette poudre doit ensuite être mélangée au(x) porogène(s) avant mise en forme pour obtenir des blocs ou des granules capables de supporter le traitement thermique.

1.1.1.2- Naphtalène :

Le naphtalène est un porogène classiquement utilisé dans de nombreuses formulations de BCP.

Le naphthalène possède une masse moléculaire de 128 g par mole, son point de sublimation est entre 80° et 82°C.

Associé à la CDA , son élimination par sublimation libère un espace poreux, volume « fantôme » du grain initial. Le choix de la granulométrie et la calibration des poudres de naphthalène revêt donc une importance toute particulière.

La matière première « naphthalène » souffre cependant de plusieurs inconvénients :

La production de grains de naphthalène de granulométrie contrôlée est compliquée par les propriétés électrostatiques de la poudre de naphthalène et son instabilité dans le temps (sublimation et tendance à l'agglomération).

Par ailleurs, le naphthalène, très volatil, diffuse dans tous les locaux et toute manipulation doit être réalisée sous hotte d'aspiration.

Le caractère auto-inflammable des vapeurs de naphthalène au-delà de 500°C impose bien entendu le respect strict de règles de sécurité lors du traitement thermique.

Enfin l'opération de tamisage en vue de l'obtention d'une granulométrie donnée souffre d'un rendement médiocre avec l'obligation de la gestion de déchets de production toxiques.

Le naphthalène utilisé provient de la société Sigma-Aldrich (France). Il est ensuite granulé et tamisé pour ne retenir qu'une fraction de l'ordre de 300 à 600 µm. Une étude par la spectrométrie infrarouge vérifie que le produit ne comporte pas d'impureté.

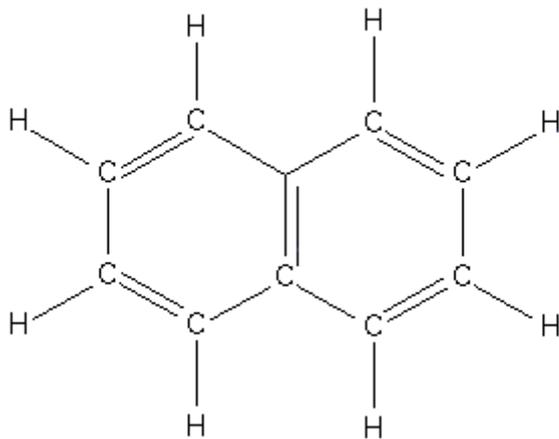


Figure 45 : formule chimique développée du naphthalène

1.1.1.3- Nouveaux porogènes :

Ces contraintes relatives à l'utilisation du naphthalène ont justifié la recherche de nouveaux porogènes :

Des travaux réalisés dans notre équipe de recherche ont étudié le comportement du lactose obtenu par granulation humide. Les résultats (non publiés) en terme de porosité et de résistance mécanique n'ont pas permis de persévérer dans cette voie. Les céramiques obtenues souffrent d'une part d'une faible porosité (40 %) et d'autre part d'une importante fragilité en dépit de la mise en œuvre de plusieurs types de traitement thermique. D'autres porogènes ont été testés, citons les dextrans dont l'incorporation n'a pas permis de produire une céramique aux propriétés mécaniques satisfaisantes. L'amidon ou le fructose, après granulation, ont aussi été incorporés en tant que porogène. Les contraintes techniques importantes inhérentes à la méthodologie employée ainsi que les caractéristiques mécaniques et physiques insuffisantes des céramiques obtenues ont conduit à l'abandon de ces formulations.

En revanche, des études ont montré l'intérêt du saccharose en tant que porogène en lieu et place du naphthalène (139).

Le saccharose a plusieurs avantages dont l'absence de toxicité, sa facilité de mise en œuvre, son faible coût et son élimination qui se fait sans laisser de résidus décelables après frittage. Le principal inconvénient de cette molécule est son hygroscopie.

Le saccharose est un disaccharide, il est hydrolysable en deux oses simples en quantité équimolaire: le D-glucose et le D-fructose.

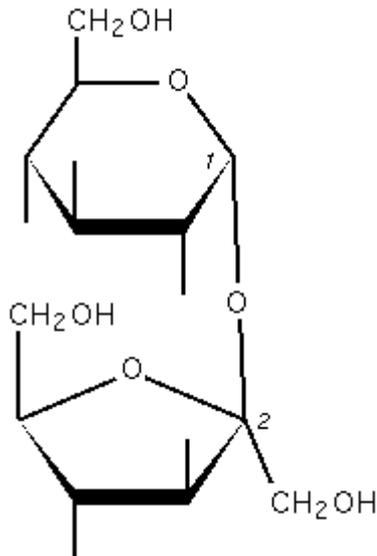


Figure 46 : formule chimique développée du saccharose

Pour l'incorporation de la poudre de saccharose, au delà d'une certaine proportion de saccharose, les céramique obtenues deviennent extrêmement fragiles et les contraintes exercées sur le matériau en cours de traitement thermique ont tendance à la fracturer (139).

1.1.2- Mise en forme :

L'élaboration de matériaux frittés céramiques ou métalliques comprend en général avant le traitement thermique et le frittage une étape de compactage. Le compactage permet d'obtenir des agglomérés ayant une résistance permettant la manipulation sans risques de fracture ou de fissuration. Il existe deux procédés de compression isostatique, l'un se faisant à chaud, l'autre à froid. La compression isostatique à chaud est souvent utilisée pour la mise en forme des céramiques (13), (73), (148), (159), mais la compression à froid est beaucoup plus facile à mettre en œuvre.

1.1.3- Traitement thermique et frittage

Le frittage est une technique employé par les céramistes. Il consiste en une consolidation de grains de poudre par chauffage à une température suffisante permettant l'établissement de « joints de grains ».

C'est une réaction réalisée à l'état solide entre les particules d'une masse de poudres qui entraîne sa consolidation et la formation d'un solide continu cohérent par transport de matières et de recristallisation. Cette réaction permet donc la création de joints de grains qui dépendent de la température, de la durée du plateau de frittage mais aussi de la vitesse de montée en température au plateau de frittage.

Trois processus ont été décrits au cours des opérations de frittage (13), (73), (148):

Simple consolidation : dans ce processus , la matière provient de la surface des particules et aboutit à un « pont » qui s'édifie progressivement et qui donne des joints de grains. Le joint de grains se forme progressivement et consolide la matière entre les grains. La densité est ainsi respectée et la distance entre les grains ne varie pas.

Consolidation et retrait : Au fur et à mesure de l'édification des joints de grains, les centres des grains se rapprochent par transport de matière dû à la diffusion de la matière. La microporosité diminue considérablement si le frittage est de longue durée.

Enfin, un phénomène de retrait et grossissement des grains peut survenir quand le matériau possède une densité importante ($>0,9$) .

Les conditions de frittage et le traitement thermique vont conditionner notamment la composition chimique ainsi que les caractéristiques structurales (répartition de la porosité et taille de grains) et mécaniques de la céramique obtenue. Toutefois, d'autres paramètres interviennent sur la qualité finale de la poudre, à savoir :

- les caractéristiques des poudres de départ (taille, forme, surface spécifique)
- la composition du phosphate de calcium
- l'atmosphère de frittage
- les conditions de frittage (sous pression ou non)

Outre le rôle majeur du traitement thermique (12), (23), (125), (135), sur les propriétés mécaniques du futur implant de BCP, le traitement thermique permet aussi la création de la porosité par élimination du ou des porogènes.

Pour le naphthalène un simple dégazage (déliantage) à la température de sublimation suffit. Ce déliantage du naphthalène se fait à 80°C,. Des dégagements gazeux importants peuvent intervenir lors d'une montée en plateau trop rapide ou d'une température du plateau d'élimination trop élevée avec risque d'apparition de fissures.

1.2- Optimisation de la porosité interconnectée :

Les résultats de la première partie ont montré qu'il existait plusieurs types d'interconnexions :

- Des interconnexions macroporeuses en petit nombre qui offrent une importante capacité de pénétration au cœur de la céramique pour les fluides, les particules et solutés, les cellules, les vaisseaux,...
- Des interconnexions mésoporeuses généralement plus nombreuses qui offrent des trajets poreux de suffisamment gros calibre pour rendre ces canaux accessibles aux cellules et particules jusqu'à 100 μ m de diamètre
- Enfin des interconnexions microporeuses qui sont rencontrées dans toutes les céramiques (diamètre d'interconnexion de 0,30 à 0,45 μ m). La perméabilité résultante est faible et les possibilités de transfert de fluides et à fortiori de particules sont beaucoup plus limitées que pour les interconnexions de plus gros calibre.

2- Matériels et méthodes

2.1- Les poudres

2.1.1- Apatite déficiente en calcium :

Il a été choisi de tester l'influence du type de poudre de CDA sur les propriétés de porosité interconnectée des BCP.

Pour ce faire, il a été utilisé deux types de poudres actuellement disponibles sur le marché :

- Une poudre dénommée « H » utilisée pour la fabrication d'une des principales céramiques phosphocalciques biphasées commercialisée sur le marché français.
- Une poudre dénommée « X » par la suite dont les caractéristiques de synthèse sont différentes de la poudre H.

Une analyse granulométrique par granulomètre laser LS200 a permis de vérifier les granulométries employées.

2.1.2- Porogènes :

Il a été choisi d'associer deux porogènes de manière à bénéficier des qualités respectives de chacun en tentant de corriger leurs inconvénients respectifs au prix d'une formulation adaptée et notamment la recherche de la proportion idéale entre ces deux porogènes.

La granulométrie utilisée correspondait à la fraction 400-630 μ m des poudres de saccharose et de naphthalène.

Une analyse des granulométries correspondantes a été menée avant toute synthèse par granulométrie Laser à l'aide d'un granulomètre Coulter LS200

Les poudres de naphthalène et le saccharose ont été mélangées avant incorporation à la poudre de CDA.

2.1.3- Mélange

Le mélange des poudres s'est fait à l'aide d'un mélangeur Krups à mouvement planétaire pendant 25 minutes.

2.2- Formulation des mélanges :

8 céramiques intitulées A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 et A8 ont été synthétisées pour mener à bien l'objectif initial. Leur composition est présentée dans le tableau 15. Les pourcentages sont donnés en volumes (v/v). Les valeurs 35 et 55% de porogène ont été choisies en s'inspirant des standards de formulation actuels permettant d'obtenir une céramique suffisamment poreuse et de résistance mécanique satisfaisante.

Nom BCP	Type de CDA	%porogène (en volume)	%CDA (en volume)	Rapport Sac/naph	Masse CDA	Masse sac	Masse naph	Qté naph
A1	X	35%	65%	1:5	162,5	22,8	83,46	83,46
A2	H	35%	65%	1:5	162,5	22,8	83,46	83,46
A3	X	55%	45%	1:5	112,5	35,82	131,15	131,15
A4	H	55%	45%	1:5	112,5	35,82	131,15	131,15
A5	X	35%	65%	1:1	162,5	68,25	50,09	50,09
A6	H	35%	65%	1:1	162,5	68,25	50,09	50,09
A7	X	55%	45%	1:1	112,5	107,25	78,72	78,72
A8	H	55%	45%	1:1	112,5	107,25	78,72	78,72

Tableau 15 : Paramètres de formulation des céramiques A1 à A8

2.2.3- Traitement thermique :

Après plusieurs essais infructueux, le choix s'est porté sur le traitement thermique détaillé dans la figure 47.

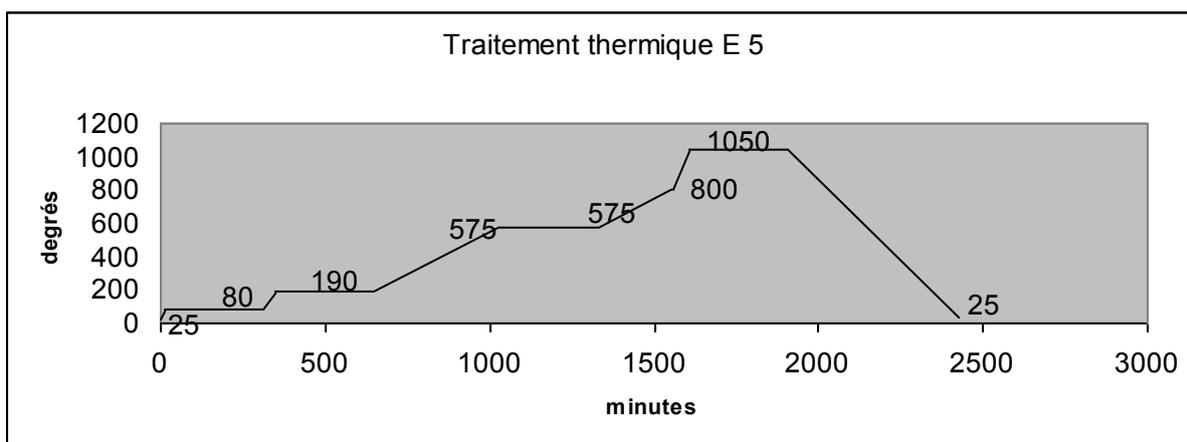


Figure 47 : Paramètres du traitement thermique des céramiques A1 à A8

On peut identifier :

- Une montée en température rapide de 25°C à 80°C à raison de 5°C / minute
- Un plateau permettant l'élimination du naphthalène lui succède. La température de 80°C est maintenue pendant 300 minutes au terme desquelles la totalité du naphthalène a disparu laissant à la place des macropores laissés libres par la sublimation du naphthalène
- Une montée en température succède à ce plateau à raison de 5°C / minute jusqu'à 190°C où un plateau de température de 300 minutes est respecté. A cette étape, le saccharose est présent sous la forme d'un composé caramélisé visqueux qui tend à envahir le réseau poreux de la pièce céramique en cours de traitement thermique.
- Au terme du plateau à 190°C, une montée en température « douce » s'opère à raison de 3°C/minute de manière à contrôler l'élimination des composés caramélisés. L'évacuation progressive à pour conséquence de ne pas fragiliser la future céramique. Le plateau qui suit à 575 °C pendant 300 minutes permet l'élimination de toute trace de composé de dégradation du saccharose.

- Une montée en température progressive de 575°C à 800°C permet de minimiser les risques de fracture de la céramique dus à une montée en température trop rapide. A partir de 800°C, la pente de température passe à 5°C minute jusqu'au palier de frittage à 1050°C qui est maintenu pendant 300 minutes.

- Le retour à la température ambiante se fait progressivement pour éviter tout choc thermique à raison de 2°C / minute

3- Résultats :

3.1- Perméabilité

Les valeurs moyennes des perméabilités (perméamètre à pression constante / n=4) sont données par le tableau suivant.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
k (m ²)	1,23.10 ⁻¹⁵	1,89.10 ⁻¹⁵	1,48.10 ⁻¹⁴	3,92.10 ⁻¹⁴	3,1.10 ⁻¹⁵	3,78.10 ⁻¹⁵	2,90.10 ⁻¹³	1,95.10 ⁻¹³
Ecart type réduit (m ²)	3,1.10 ⁻¹⁶	2,8.10 ⁻¹⁶	5,3.10 ⁻¹⁵	2,9.10 ⁻¹⁵	4,4.10 ⁻¹⁶	6,0.10 ⁻¹⁶	8,3.10 ⁻¹⁴	7,1.10 ⁻¹⁴

Tableau 16 : Perméabilités moyennes des céramiques A1 à A8 déterminées par perméamétrie à pression constante

3.2- Tortuosité

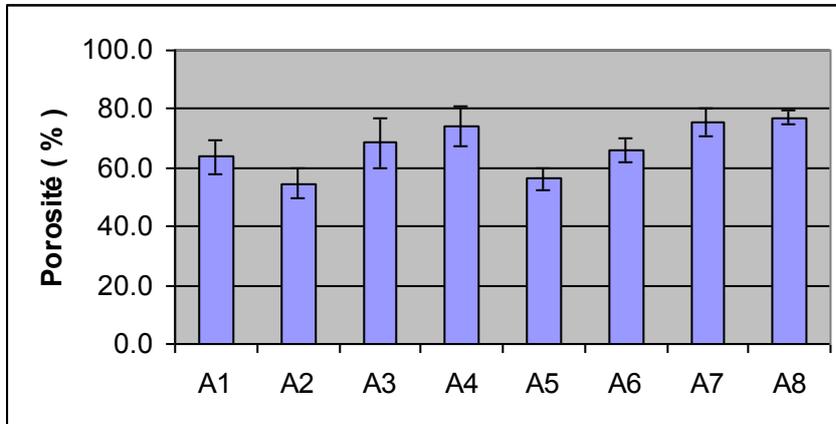
Les valeurs moyennes des facteurs de tortuosité (n=3) sont données par le tableau suivant.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Tf	19,3	24,1	7,4	7,0	17,2	11,7	8,3	12,4
Ecart type réduit	6,1	5,8	3,1	2,9	4,7	6,1	2,9	3,8

Tableau 17 : Tortuosités moyennes des céramiques A1 à A8 déterminées par diffusion d'un ion traceur

3.3- Porosité et porogramme

Les résultats de porosité sont donnés par le graphique 7:



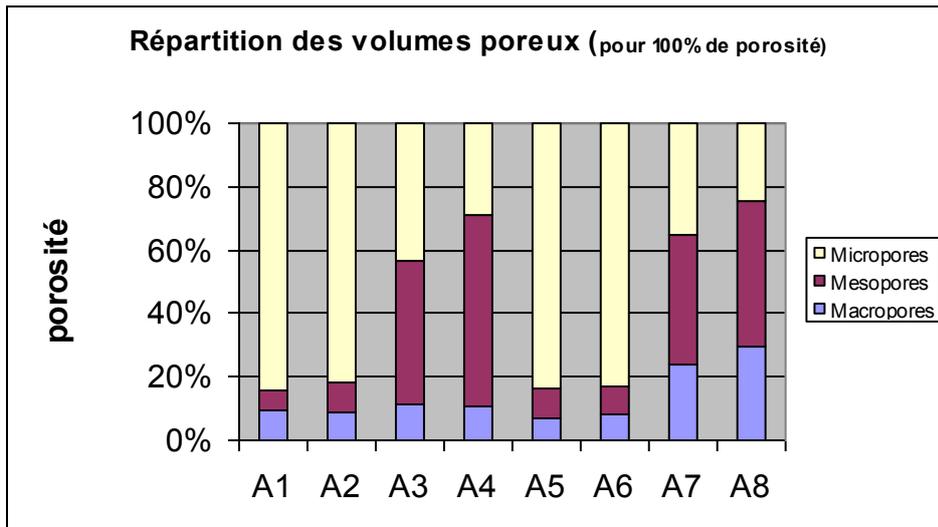
Graphique 7 : Porosités totales des céramiques A1 à A8 déterminées par porosimétrie à mercure

Une différence significative de porosité accessible au mercure est constatée pour les céramiques formulées à partir de 35% de porogène (porosité moyenne de 60 %) et les céramiques formulées à partir d'un pourcentage de porogène de 55% (porosité moyenne de 74%).

La répartition de la porosité pour chacun des échantillons est donnée par le graphique 8 .

La porosité des échantillons formulés à partir de 35 % de porogène est essentiellement de nature microporeuse (>80 % de la porosité totale). Le volume poreux restant se répartissant à parts à peu près égales en macro et mésopores.

En revanche, la porosité des échantillons formulés à partir de 55 % de porogène est beaucoup plus hétérogène avec une fraction mésoporeuse majoritaire de 40% à 60%, une fraction macroporeuse importante de 10% à 29% et une proportion de micropores de 24 à 43 %



Graphique 8 : Porogrammes des céramiques A1 à A8 déterminées par porosimétrie à mercure

3.3.2- Profils d'intrusion de mercure

3.3.2.1- Céramiques A1 et A2

Les profils d'intrusion de mercure de A1 et A2 illustrent les résultats précédents :

- un volume poreux accessible au mercure limité (< 0,65ml de mercure par gramme de matériau poreux).
- Une faible proportion de macro et mésopores

La figure 48 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de A1.

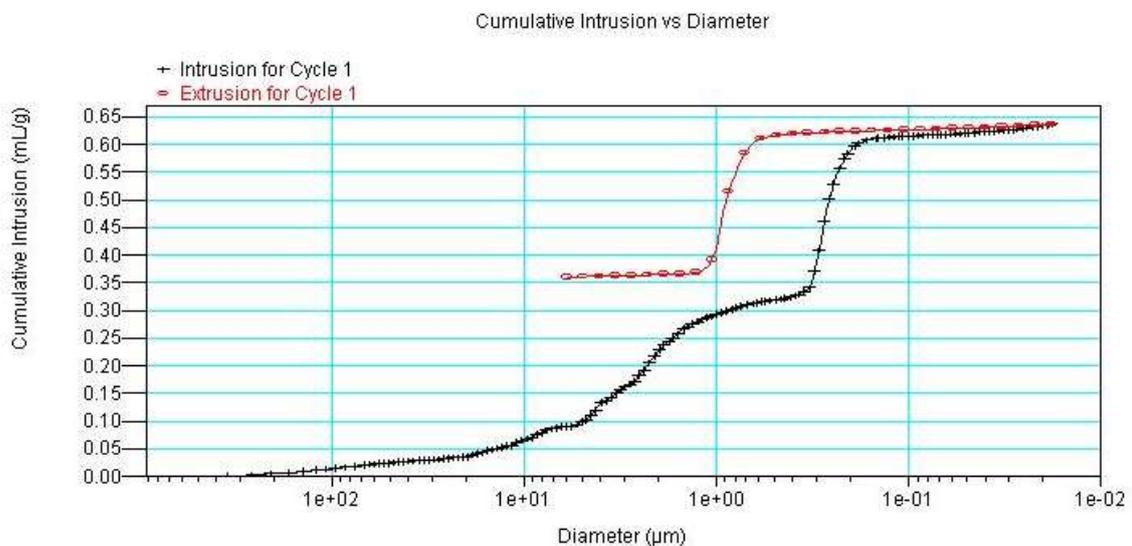


Figure 48 : profil d'intrusion de mercure de A1

3.3.2.2- Céramiques A3 et A4

Les profils d'intrusion de mercure de A3 et A4 montrent :

- un volume poreux accessible au mercure important ($< 1,3$ ml de mercure par gramme de matériau poreux).
- Une forte proportion de mésopores et dans une moindre mesure de macropores

La figure 49 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de A4.

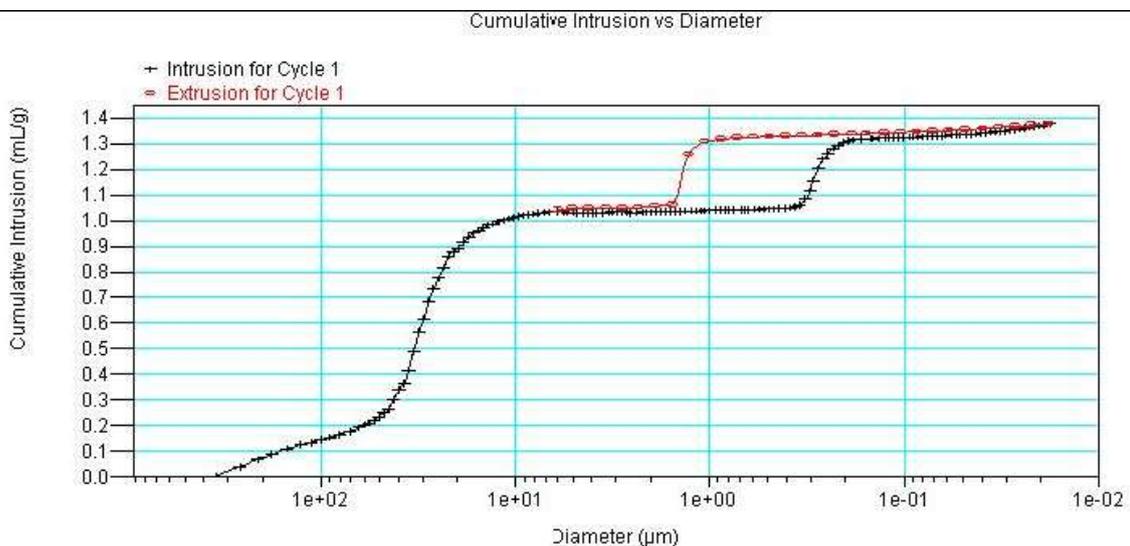


Figure 49 : profil d'intrusion de mercure de A4

3.3.2.3- Céramiques A5 et A6

Les profils d'intrusion de mercure de A5 et A6 montrent :

- un volume poreux accessible au mercure faible ($< 0,65$ ml de mercure par gramme de matériau poreux).
- Une forte proportion de micropores au détriment des macro et mésopores

La figure 50 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de A6.

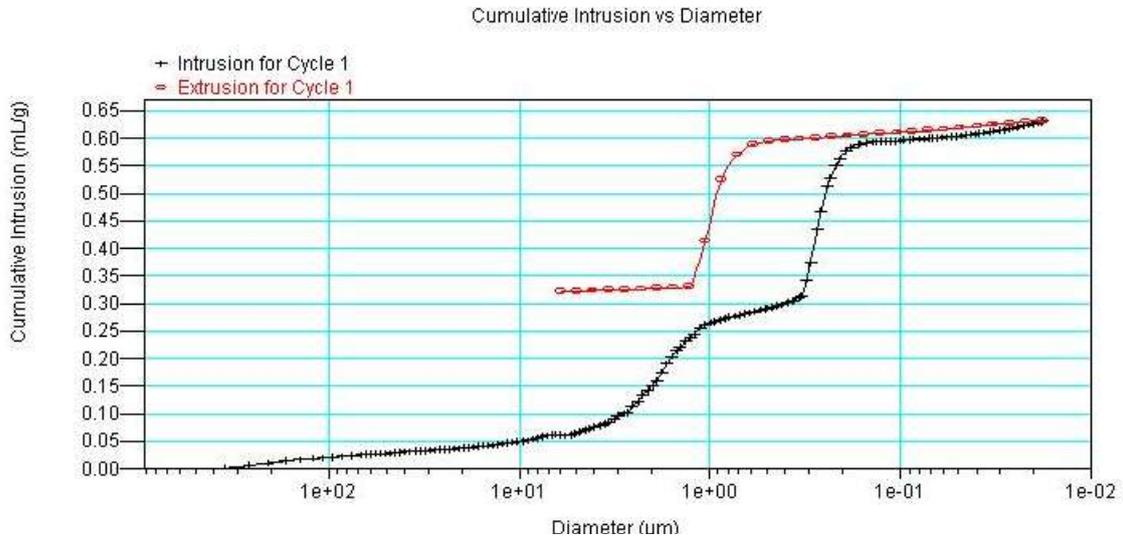


Figure 50 : profil d'intrusion de mercure de A6

3.3.2.4- Céramiques A7 et A8

Les profils d'intrusion de mercure de A7 et A8 montrent :

- un volume poreux accessible au mercure élevé (> 2 ml de mercure par gramme de matériau poreux).
- Une forte proportion de mésopores et de macropores

La figure 51 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de A8.

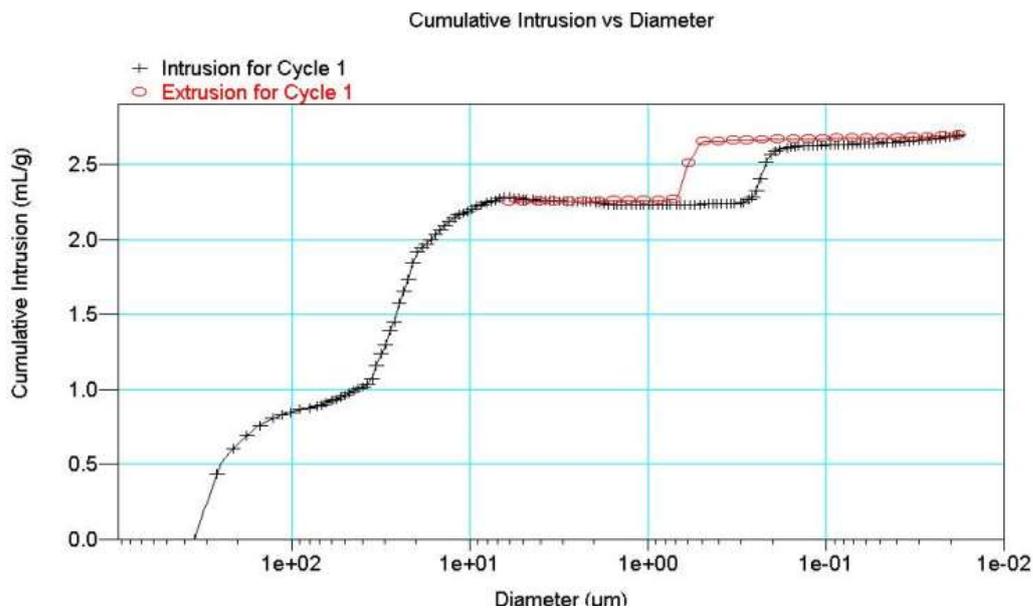


Figure 51 : profil d'intrusion de mercure de A8

3.3.3- Perméabilités fractionnées

Le tableau 18 présente les valeurs des perméabilités par classes de pores données par le logiciel Pore Cor

K (Darcies)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
macropores	66.6 ± 15.1	10.5 ± 5.2	194.2 ± 23	158.1 ± 31.1	99.2 ± 32.1	176 ± 23	95.5 ± 17,2	88.8 ± 19,5
mésopores	1.35 ± 0,39	0.95 ± 0,49	4.66 ± 0,22	2.44 ± 0,10	1.31 ± 0,21	3,00 ± 1.62	5.2 ± 0,28	2.90 ± 0,21
micropores	0.00153 ± 0,00022	0.00151 ± 0,00031	0.0043 ± 0,001	0.00142 ± 0,0018	0.00129 ± 0,00337	0.00200 ± 0,00028	0.00101 ± 0,00033	0.00650 ± 0,00028

Tableau 18 : Valeurs des perméabilités fractionnées des céramiques A1 à A8

3.3.4- Diamètres équivalent des canaux d'interconnexion :

Le tableau 19 présente les valeurs des diamètres équivalents des canaux d'interconnexion (D50).

D50 (µm)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
macropores	157 ± 12	145 ± 24	197 ± 10	198.1 ± 31	68.5 ± 8	119 ± 21	95.5 ± 17	244 ± 33
mésopores	1.8 ± 0.5	3.2 ± 0,6	17.0 ± 3.5	28.0 ± 4.9	2.6 ± 0.4	2.30 ± 0.3	21.3 ± 3.3	27.0 ± 4.0
micropores	0.41 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.29 ± 0.08	0.29 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.34 ± 0.07	0.34 ± 0.06	0.28 ± 0.07

Tableau 19 : Valeurs des diamètres des canaux d'interconnexion des céramiques A1 à A8

3.3.4- Modélisations Pore Core

Les modélisations à l'aide du logiciel Pore Cor sont semblables deux à deux et données par la figure 52.

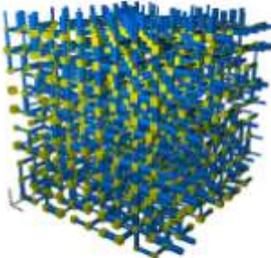
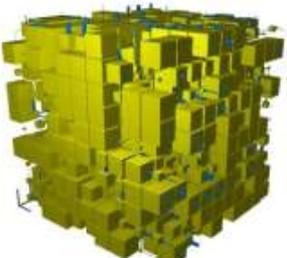
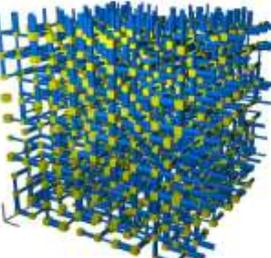
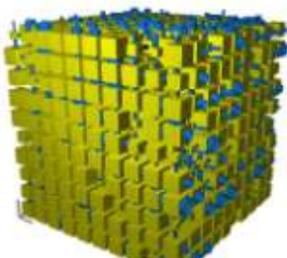
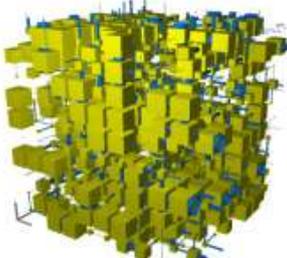
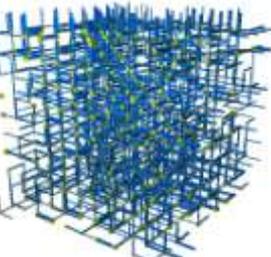
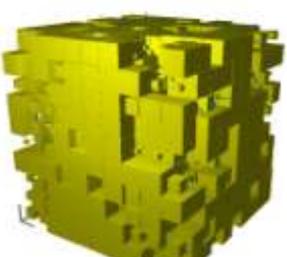
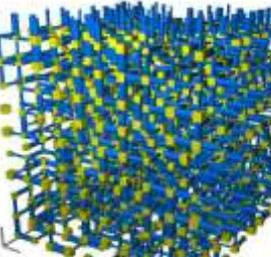
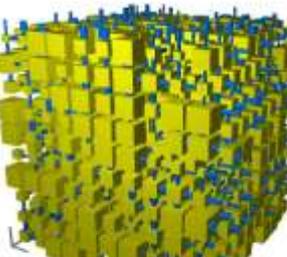
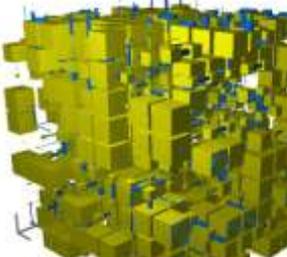
	Modélisation structure macroporeuse	Modélisation structure mésoporeuse	Modélisation structure microporeuse
A1 et A2		Non modélisable	
A3 et A4			
A5 et A6		Non modélisable	
A7 et A8			

Figure 52 : représentation des volumes poreux interconnectés des céramiques A1 à A8 selon le logiciel Pore Cor

4- Discussion

L'objectif de cette seconde partie est d'identifier le rôle des principaux paramètres qui gouvernent la mise en place de la structure poreuse interconnectée des céramiques phosphocalciques biphasées.

Pour ce faire 3 paramètres susceptibles d'avoir une influence sur l'interconnexion de la porosité ont été identifiés (35):

- Le **type de CDA** : CDA « H » ou « X »

- La **proportion en porogène** : 35 ou 55 % du volume total

- Le **ratio des porogènes** employés : Ratio Naphtalène / Saccharose (N/S) de 1/1 ou de 5/1.

4.1- Influence du type de CDA :

Les 2 types de CDA employés donnent des BCP dont les caractéristiques de porosité et d'interconnexion sont très similaires.

Les valeurs des porosités, les porogrammes et les profils d'intrusion de mercure sont très semblables pour chacun des 4 couples de céramiques (A1 et A2 / A3 et A4 / A5 et A6 / A7 et A8). Le type de CDA ne semble pas avoir d'influence à ce niveau.

Il en va de même pour les perméabilités « globales » (perméabilités à pression constante), les perméabilités fractionnées (Logiciel Pore Cor) et les facteurs de tortuosité pour lesquels les résultats semblables pour une proportion de porogène (35 ou 55%) et un ratio donné entre les porogènes (N/S = 1/1 ou 5/1)

Enfin les représentations tridimensionnelles des volumes poreux données par le logiciel Pore Cor sont aussi très semblables pour chaque type de céramique.

Le type de CDA « H » ou « X » ne semble pas avoir d'effet sur la porosité et les paramètres d'interconnexion des céramiques qui ont été synthétisées.

4.2- Influence de la proportion en porogène :

Les résultats traduisent un effet majeur de la quantité de porogène qui est mélangé à la CDA avant compression isostatique et frittage.

4.2.1- Influence sur la porosité :

La porosité obtenue pour les céramique formulées à partir de 35% de porogène (quel que soit le ration N/S) est significativement inférieure à celles formulées à partir de 55% de porogène (60 % versus 74 % environ). Plusieurs auteurs ont décrit cet effet qui corrèle la quantité de porogène à la porosité totale de la céramique obtenue.

4.2.2- Influence sur la perméabilité :

4.2.2.1- Perméabilité globale :

La perméabilité et la tortuosité sont aussi profondément modifiées par une augmentation de la proportion de porogène dans le mélange des poudres.

Une différence significative de perméabilité ($p < 0.05$) est observée entre les groupes 35% et 55% de porogène. Les perméabilités du groupe 35% varient entre $1,23 \cdot 10^{-15} \text{m}^2$ et $3,78 \cdot 10^{-15} \text{m}^2$ contre des valeurs de perméabilités comprises entre $1,48 \cdot 10^{-14}$ et $1,95 \cdot 10^{-13} \text{m}^2$ pour le groupe 55% de porogène.

4.2.2.2- Perméabilités fractionnées :

Les valeurs des perméabilités fractionnées sont plus complexes à analyser. Il a été fait le choix de ne pas prendre en compte les valeurs des perméabilités dues aux macropores. Les

valeurs correspondantes étaient en effet sans rapport avec les perméabilités usuelles pour l'os trabéculaire, pourtant considéré comme l'étalon haut en terme d'interconnexion (120).

Une des explications à cette valeur incohérente est liée à la technique de mesure par porosimétrie à mercure. Le premier palier de pression (premier point de la courbe d'intrusion de mercure) est réalisée pour une pression de 0.50 à 0.51 Psi soit une possibilité d'intrusion du mercure dans les canaux de 350 μm de diamètre environ. S'il existe des macropores présents en surface de l'échantillon et de diamètre supérieur à 350 μm , l'intrusion de mercure peut survenir sans application d'une pression extérieure. La conséquence étant une perméabilité de surface due à la présence de ces macropores.

La perméabilité de surface n'est donc pas représentative de la perméabilité et de l'interconnexion de la céramique.

En tenant compte de cet élément, les céramiques du groupe 55 % de porogène présentent une perméabilité due à des mésopores significativement plus élevée que les céramiques formulées à partir de 35% de porogène.

L'augmentation du pourcentage de porogène à la formulation permet donc le développement d'une interconnexion essentiellement de nature mésoporeuse (faible participation de la perméabilité microporeuse à la perméabilité totale).

4.2.3- Influence sur la Tortuosité :

Le facteur de tortuosité est moins affecté que la perméabilité par le % de porogène.

Une valeur du facteur de tortuosité significativement différente est observée entre les céramiques formulées à partir de 35 et de 55% de porogène. Seule la céramique A6 possède une tortuosité non significativement différente des formule à 55% de porogène.

4.2.4- Influence sur D50 :

Pour les mêmes raisons que celles exprimées pour les perméabilités fractionnées, seuls les D50 dus à des mésopores ou des micropores seront pris en compte.

Une augmentation de la proportion du porogène se traduit par une augmentation de la taille des canaux d'interconnexions mésoporeux. Une différence significative ($p < 0.05$) est en effet observée entre les 2 formulations étudiées.

4.2.5 Influence sur les modélisations 3D :

Si l'on ne tient compte que des modélisations méso et microporeuses, il peut être observé deux phénomènes :

- Tout d'abord les modélisations microporeuses sont très similaires pour toutes les céramiques étudiées. Le changement du % de porogène ne semble pas influencer sur la modélisation des volumes poreux interconnectés. Ce résultat est cohérent avec les valeurs de perméabilités fractionnées microporeuses qui apparaissent semblables pour tous les BCP.
- Seules les modélisations des BCP formulés avec 55% de porogène ont pu être réalisées à l'aide du logiciel Pore Cor. Le faible nombre de mésopores (environ 10% de la porosité totale), malgré l'existence d'une perméabilité assez importante de l'ordre de $10-15 \text{ m}^2$ (1mD) est responsable de ce phénomène.

4.3- Influence du ratio Naphtalène / Saccharose (N/S) :

4.3.1- Influence sur la porosité :

Il semble ne pas exister de différence de porosité entre les céramiques formulées à partir de 35% de porogène et celles formulées à partir de 55% de porogène.

Ceci s'entend tous autres paramètres de formulation identiques. Ainsi les céramiques A1 et A5, qui ont pour seule différence leur ratio N/S égal à 5/1 dans le premier cas et 1/1 dans le second, ont des porosités non significativement différentes ($t < 0.05$).

De la même manière, il n'existe pas d'influence du rapport N/S sur la répartition en classes de pores tous autres paramètres étant identiques

4.3.2- Influence sur la perméabilité :

4.3.2.1 Perméabilité globale :

Une différence significative de perméabilité (perméamétrie à pression constante) ($p < 0.05$) est observée entre les céramiques formulées avec un rapport N/S de 5/1 et de 1/1.

De manière générale, la perméabilité la plus élevée est observée pour les céramiques dont le rapport N/S est de 1/1.

Ainsi A5 possède une perméabilité supérieure à A1. Il en va de même pour A6 vis à vis de A2, de A7 vis à vis de A3 et de la céramique A8 vis à vis de A4.

Tous autres paramètres de formulation équivalents, il apparaît que le rapport N/S de 5/1 est moins favorable que le rapport 1/1 pour améliorer la perméabilité d'un implant de BCP.

4.3.2.1 Perméabilités fractionnées :

L'analyse de l'influence du ratio N/S sur les perméabilités fractionnées est moins concluante : On observe que les perméabilités dues à des mésopores sont équivalentes pour les couples A1/A5 et A2/A6. C'est à dire pour les céramiques dont la proportion de porogène est de 35%

En revanche, les couples de céramiques A3/A7 et A4/A8 présentent des valeurs de perméabilités dues à des mésopores significativement différentes. Ces dernières céramiques sont formulées avec 55% de porogène.

Une des explications qui pourrait être avancée est qu'un certain niveau de porosité global est requis pour que le rapport N/S puisse avoir un rôle sur la perméabilité et l'interconnexion. De toute évidence, l'augmentation de la proportion de saccharose a un effet bénéfique sur l'interconnexion à partir d'un certain niveau de porosité.

4.3.2- Influence sur le facteur de tortuosité :

De manière générale, hormis pour les BCP A2 et A6 ($T_f A2 > T_f A6$ ($p < 0.05$)), il n'a pas été observé d'influence particulière du rapport N/S sur le paramètre tortuosité.

4.3.3- Influence sur le D50 :

Il n'existe pas de différence significative entre les valeurs des D50 des couples A1/A5, A2/A6, A3/A7 et A4/A8 ($p < 0.05$)

4.3.4 Influence sur les modélisations 3D :

Il n'existe pas de différence dans les modélisations tridimensionnelles pour les couples A1/A5, A2/A6, A3/A7 et A4/A8.

4.4- Conclusion

Influence du type de CDA sur les paramètres de porosité et d'interconnexion :

Le type de CDA (« X » ou « H ») n'a pas d'effet sur la porosité et sur les paramètres d'interconnexion des céramiques synthétisées.

Influence de la proportion de porogène sur les paramètres de porosité et d'interconnexion :

L'augmentation de la quantité du porogène à la formulation initiale a pour conséquences :

- Une augmentation de la porosité totale et tout particulièrement de la fraction mésoporeuse de la porosité
- Une augmentation de la perméabilité et une diminution du facteur de tortuosité

Influence des proportions respectives entre le naphtalène et le saccharose sur les paramètres de porosité et d'interconnexion :

La modification du ratio N/S de 5/1 à 1/1 a pour conséquence :

- Une augmentation de la perméabilité globale impliquant la fraction mésoporeuse et uniquement dans le cas des céramiques les plus poreuses (formulées à partir de 55 % de porogène)

Partie 4 : Rôle du saccharose dans l'optimisation de l'architecture poreuse interconnectée

1- Introduction

Les céramiques A1 à A8 ont été analysées afin d'identifier certains paramètres de formulation pouvant avoir un rôle sur l'architecture poreuse interconnectée des BCP.

Les résultats de la partie précédente traduisent une forte influence de la quantité de porogène introduite à la formulation initiale sur l'augmentation de la porosité totale et l'amélioration des paramètres d'interconnexion. En revanche, le rapport Naphtalène / Saccharose semble avoir un effet plus limité pour ces mêmes céramiques ce qui se traduit par une augmentation de la perméabilité globale impliquant la fraction mésoporeuse uniquement dans le cas des céramiques les plus poreuses.

Outre ses propriétés « porogènes » intrinsèques, le saccharose paraît donc jouer un rôle « interconnectant » sans qu'il soit possible de connaître son implication exacte dans la création de l'interconnexion.

L'objectif de cette 4ème partie est donc :

- d'optimiser l'architecture poreuse interconnectée des BCP par la recherche du meilleur rapport N/S
- d'améliorer la connaissance du rôle du saccharose en tant que porogène associé au naphtalène.

2- Matériels et méthodes

2.1-Matériels :

Seule la poudre de CDA de type « H » a été retenue pour la synthèse des céramiques, le paramètre « type de CDA » s'étant révélé « neutre » sur l'obtention d'un niveau d'interconnexion donné.

La proportion « 55% de porogène » a été retenue en raison de la supériorité en terme d'interconnexion des céramiques produites à partir de ce niveau de porogène (m/m)

Enfin, des poudres de naphtalène et de saccharose de granulométrie 400-630 μ m ont été associées à la poudre de CDA avant mélange selon les proportions définies dans le tableau XXX.

Une analyse granulométrique par granulomètre laser LS200 a permis de vérifier les granulométries des différentes poudres employées.

Les modalités du mélange des poudres, la mise en forme par compression isostatique et le traitement thermique sont identiques en tous points à la méthodologie définie dans la partie précédente.

Les formules des céramiques B1 à B7 sont données par le tableau suivant :

Nom BCP	Type de CDA	%porogène (en volume)	%CDA (en volume)	Rapport Sac/napth	Masse CDA	Masse saccharose	Masse naphtalène
B1	H	55%	45%	0 : 6	56,25 g	0	78,69 g
B2	H	55%	45%	1 : 5	56,25 g	17,91 g	65,57 g
B 3	H	55%	45%	2 : 4	56,25 g	35,82 g	52,46 g
B 4	H	55%	45%	3 : 3	56,25 g	53,63 g	39,36 g
B 5	H	55%	45%	4 : 2	56,25 g	71,50 g	26,24 g
B 6	H	55%	45%	5 : 1	56,25 g	89,38 g	13,12 g
B 7	H	55%	45%	6 : 0	56,25 g	107,25 g	0

Tableau 20 : Paramètres de formulation des céramiques B1 à B7

2.2- Méthodes

Les méthodes d'analyse utilisées pour caractériser l'architecture poreuse des céramiques sont identiques à celles développées dans les parties précédentes.

3- Résultats :

3.1- Perméabilité

Les valeurs moyennes des perméabilités (perméamètre à pression constante / n=5) sont données par le tableau 21.

BCP (N/S)	B1 (6:0)	B2 (5/1)	B3 (4/2)	B4 (3/3)	B5 (2/4)	B6 (1/5)	B7 (0/6)
k (m ²)	2,29.10-15	3,92.10-14	8,77.10-14	1,95.10-13	3,77.10-13	9,11.10-13	3,81.10-12
Ecart type réduit (m ²)	7,7.10-16	2,9.10-15	1,21.10-14	7,1.10-14	8,61.10-14	1,8.10-13	8,27.10-13

Tableau 21 : résultats de perméabilité des céramiques B1 à B7 déterminées par perméométrie à pression constante

La laminarité de l'écoulement est vérifiée par le calcul du nombre de Reynolds qui est dans tous les cas inférieur à 0.1. L'écoulement est donc laminaire et la loi de Darcy est utilisable.

D'importantes différences de perméabilité sont relevées, la céramique B7 est 1600 fois plus perméable que la céramique B1.

3.2- Tortuosité

Les valeurs moyennes des facteurs de tortuosité (Technique de diffusion d'un ion traceur / n=3) sont données par le tableau 22.

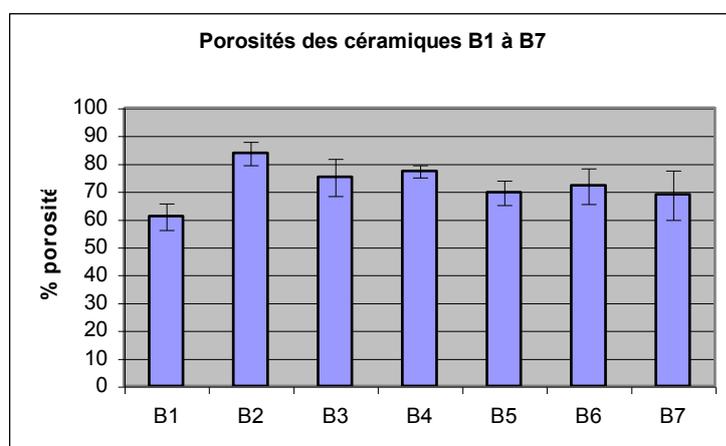
N/S	B1 (6:0)	B2 (5/1)	B3 (4/2)	B4 (3/3)	B5 (2/4)	B6 (1/5)	B7 (0/6)
k (m ²)	88,9	7,0	18,6	12,4	11,2	8,2	6,2
Ecart type réduit (m ²)	10,5	3,4	8,0	3,8	5,6	4,1	3,9

Tableau 22 : résultats de tortuosité des céramiques B1 à B7 déterminées par diffusion d'un ion traceur

La céramique dont l'architecture poreuse est dotée du facteur de tortuosité le plus élevé est la céramique B1. Les autres céramiques ont un facteur de tortuosité dont la valeur est comprise entre 7 et 18,6.

3.3- Porosité et porogramme

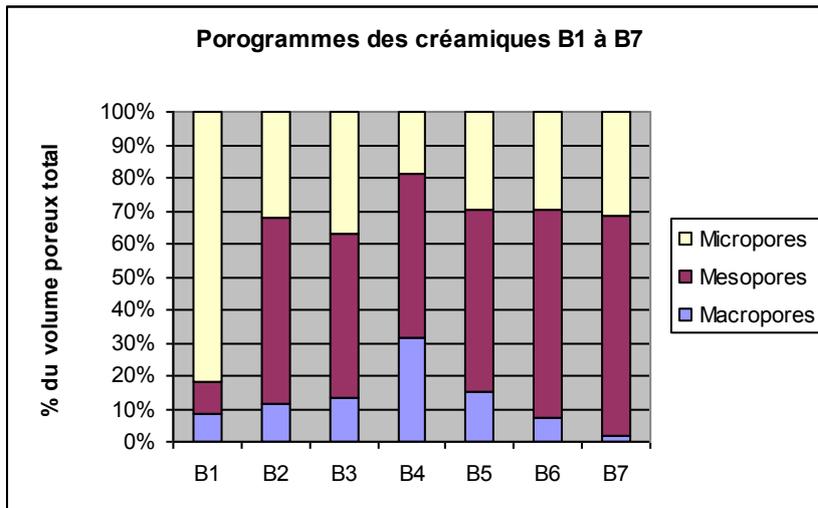
Les résultats de porosité (porosimètre à mercure) sont donnés par le graphique 9 (n=5) :



Graphique 9 : Résultats de porosité totale des céramiques B1 à B7 déterminées par porosimétrie à mercure

Les valeurs des porosités sont assez similaires et comprises entre 60 et 84 %. Seule B2 semble dotée d'une porosité légèrement supérieure avec une différence significative de porosité entre B2 et B1.

La répartition en macro, méso et micropores est donnée par le graphique 10 :



Graphique 10 : Porogrammes des céramiques B1 à B7 déterminées par porosimétrie à mercure

Seule la céramique B1 possède une architecture poreuse essentiellement composée de micropores (> 80% du volume poreux total).

Les céramiques B2 à B6 présentent une porosité de nature macro/méso et microporeuse avec une forte implication des mésopores.

Enfin, la céramique B7 est dotée d'une porosité de type méso et microporeuse avec une très faible participation des macropores.

3.4- Profils d'intrusion de mercure

3.4.1- Céramique B1 (N/S = 6 : 0)

Le profil d'intrusion de mercure de B1 illustre les résultats précédents avec notamment une faible proportion des macro et mésopores

La figure 53 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de B1.

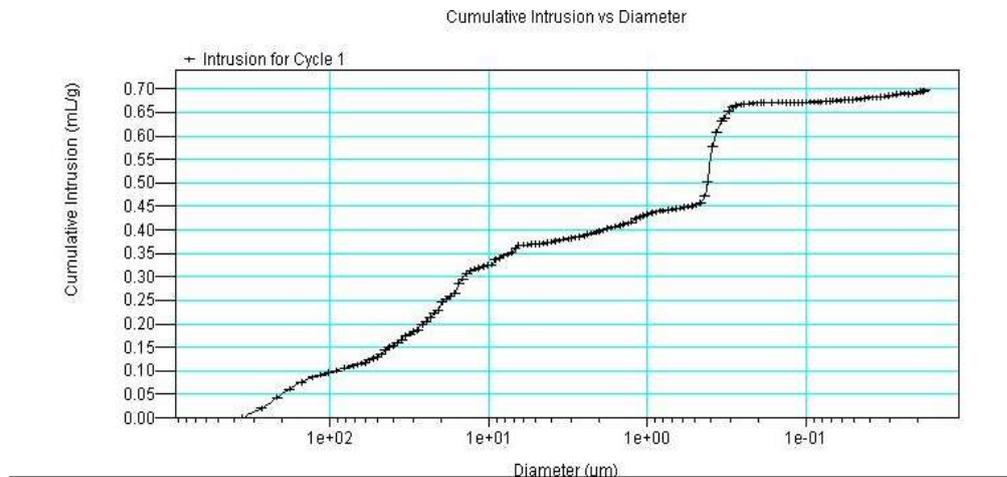


Figure 53 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B1

3.4.2- Céramiques B2 (N/S = 5 : 1) et B3 (N/S = 4 : 2)

Les profils d'intrusion de mercure de B2 et B3 sont très semblables et montrent :

- un volume poreux accessible au mercure élevé donc une forte porosité de la céramique
- Une forte proportion de mésopores et de macropores tout en conservant un réseau microporeux très développé

La figure 54 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de B3.

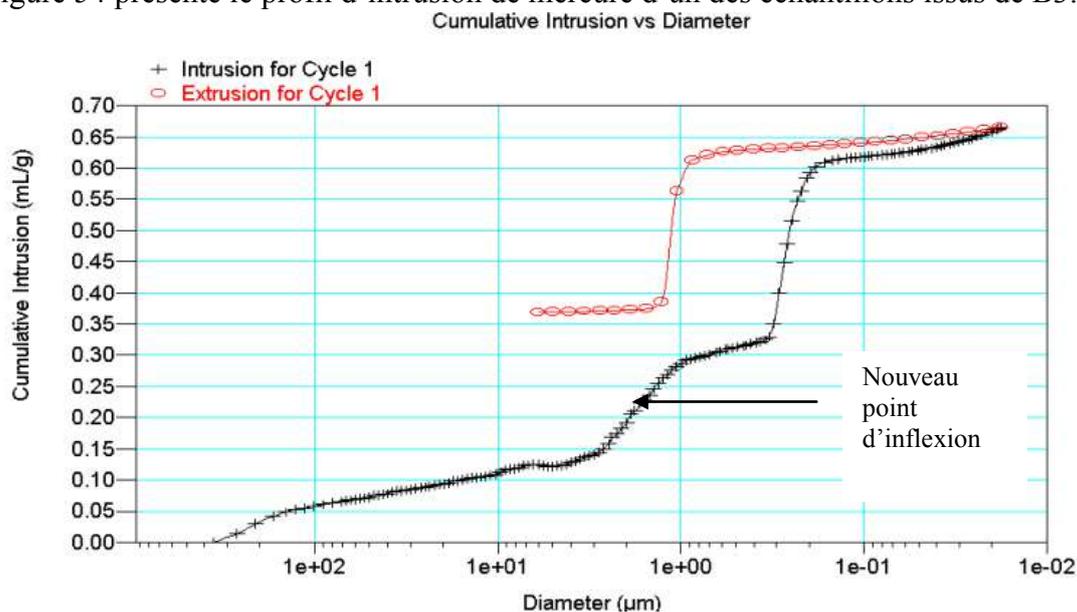


Figure 54 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B3

Il est à noter l'apparition d'un nouveau point d'inflexion pour une taille de pores de 2 à 3 μm qui correspond à une capacité offerte par la céramique à offrir un réseau poreux perméable laissant pénétrer le mercure.

3.4.3- Céramiques B4 (N/S = 3 : 3), B5 (N/S = 2 : 4) & B6 (N/S = 1 : 5)

Les profils d'intrusion de mercure de B4, B5 et B6 révèlent un volume poreux accessible au mercure et une forte proportion de mésopores tout en conservant un réseau macroporeux développé.

La figure 55 présente le profil d'intrusion de mercure d'un des échantillons issus de B4 (N:S = 3 :3).

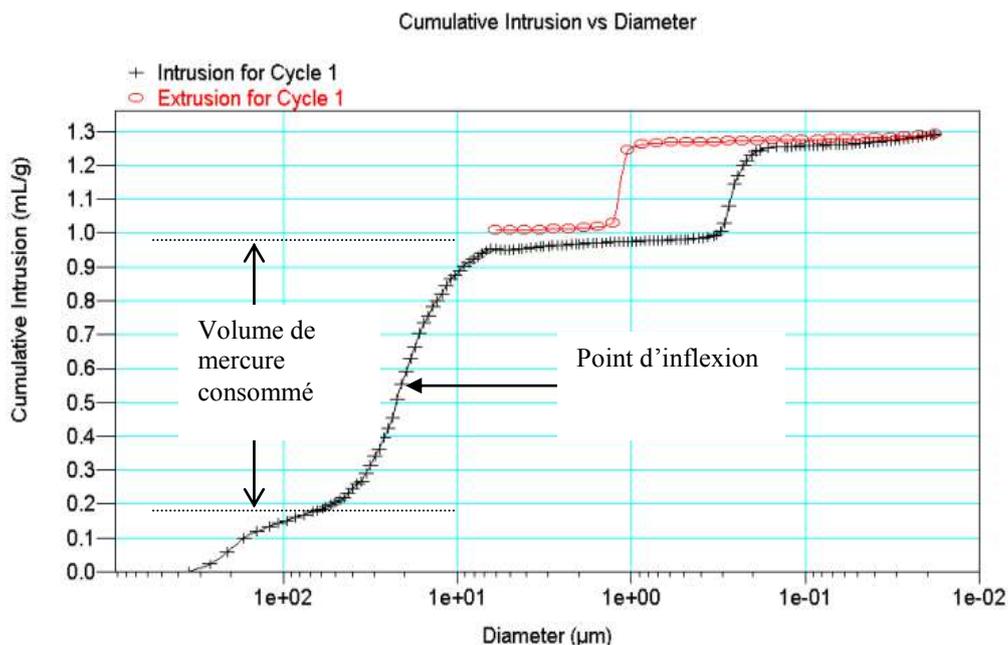


Figure 55 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B4

Le point d'inflexion apparu pour les céramiques B2 et B3 s'est déplacé en direction des tailles de pores plus élevées (10-20 μm au lieu de 2-3 μm observé pour B2 ou B3). Ce type de pores impliqué dans la pénétration du mercure (mésopores) est à l'origine d'une forte porosité (volume de mercure consommé).

3.4.4- Céramique B7 (N/S = 0 : 6)

Le profil d'intrusion de mercure de B7 montre un volume poreux accessible au mercure et une très forte proportion de mésopores (figure 56).

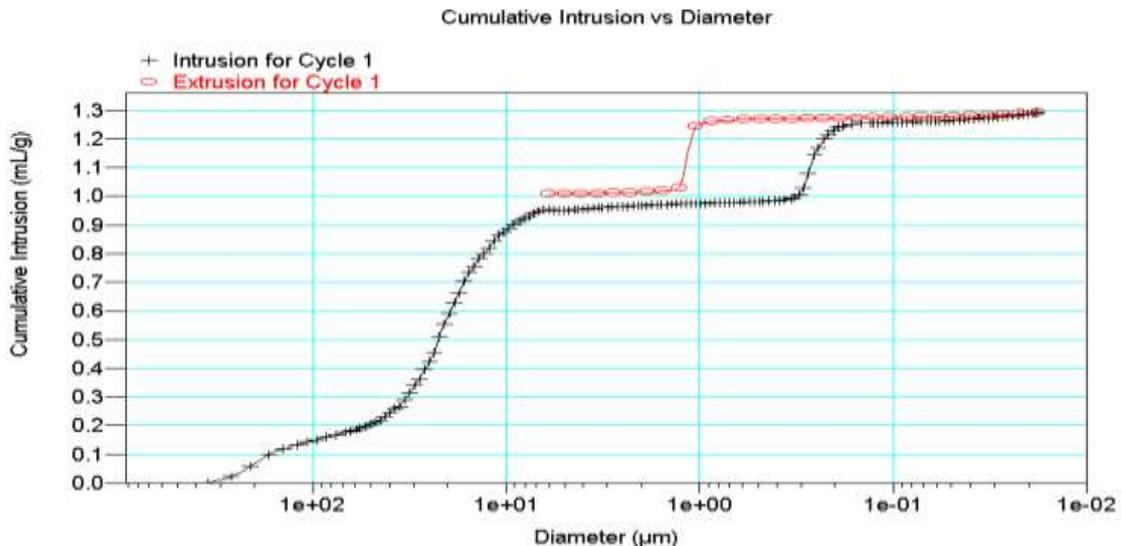


Figure 56 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B7

3.5- Perméabilités fractionnées

Le tableau 23 présente les valeurs moyennes (n=5) des perméabilités par classes de pores données par le logiciel Pore Cor

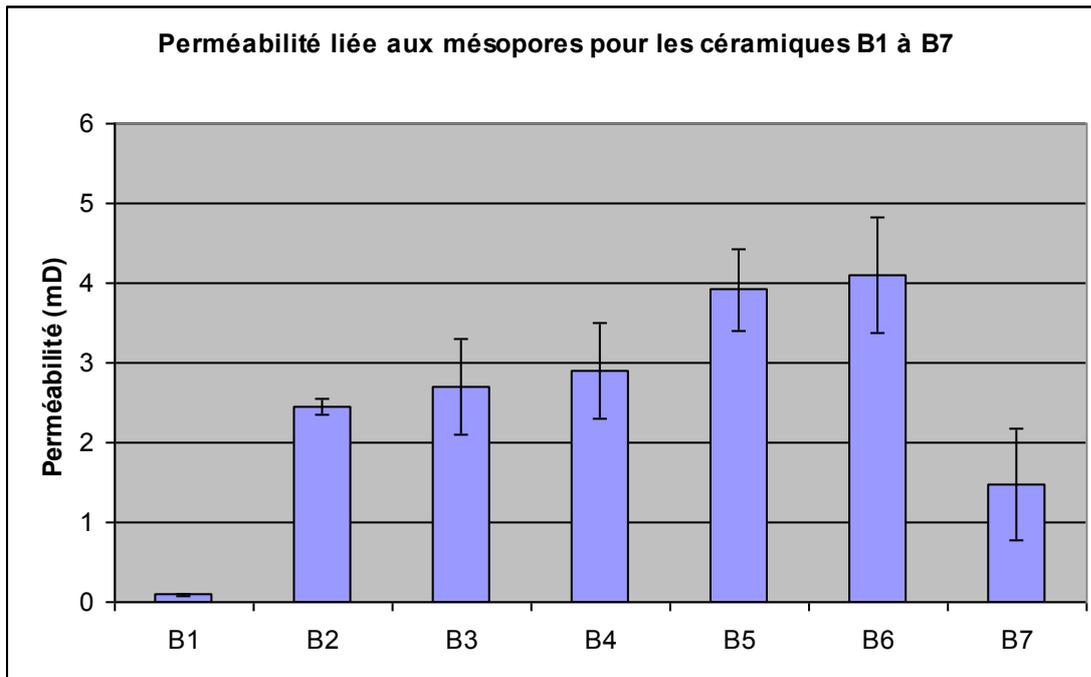
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
K macropores (mD)	382 ± 43	158 ± 31	122 ± 12	89 ± 19	77 ± 13	69 ± 19	55 ± 15
K mésopores (mD)	0.09 ± 0.01	2.44 ± 0.10	2.70 ± 0.61	2.90 ± 0.61	3.92 ± 0.51	4.1 ± 0.72	1.48 ± 0.70
K micropores (mD)	0.00109 ± 0.00025	0.00142 ± 0.00018	0.00242 ± 0.00099	0.00650 ± 0.00028	0.000979 ± 0.0018	0.00278 ± 0.00015	0.00492 ± 0.0012

Tableau 23 : Résultats des perméabilités fractionnées des céramiques B1 à B7

Tout comme dans la partie précédente, seules les perméabilités dues aux mésopores et aux micropores doivent être prises en compte. La perméabilité attribuée aux macropores par le

logiciel Pore Cor est une perméabilité de surface qui survient pour de très faibles pressions d'intrusion.

Pour les céramiques étudiées la perméabilité est essentiellement liée à la fraction mésoporeuse de la porosité (sauf pour B1 dont la perméabilité mésoporeuse est faible) avec une très faible participation des micropores à ce phénomène (graphique 11).



Graphique 11 : Résultats de perméabilité de la fraction mésoporeuse des céramiques B1 à B7

La tendance est à l'augmentation de la perméabilité due aux mésopores de B1 à B6 (au fur et à mesure que la proportion en saccharose augmente) puis une diminution de ce paramètre pour B7, céramique formulée à partir de 100% de saccharose.

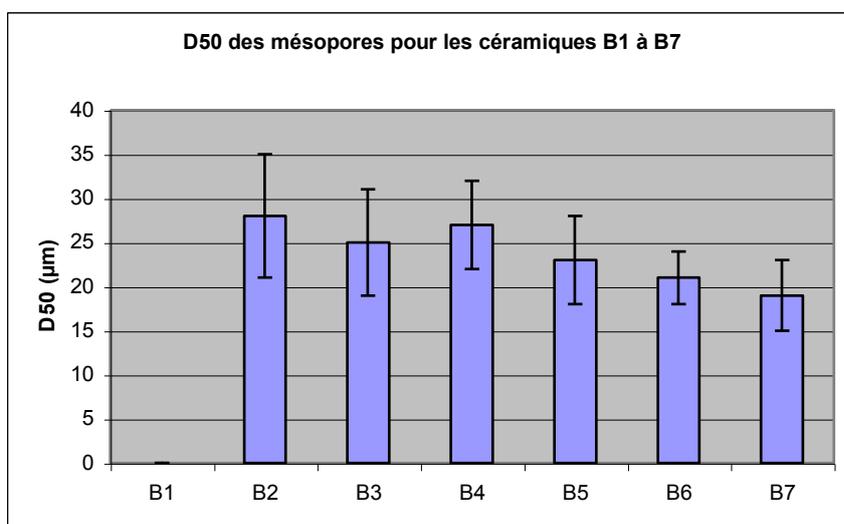
3.6- Diamètres équivalent des canaux d'interconnexion :

Le tableau 24 présente les valeurs moyennes (n=5) des diamètres équivalents des canaux d'interconnexion (D50).

Céramique	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
D50 macropores (μm)	248 ± 31	198 ± 25	212 ± 12	244 ± 14	202 ± 10	228 ± 18	208 ± 17
D50 mésopores (μm)	<i>Pas de D50</i>	28 ± 7	25 ± 6	27 ± 5	23 ± 5	21 ± 3	19 ± 4
D50 micropores (μm)	0.53 ± 0.11	0.29 ± 0.06	0.33 ± 0.09	0.28 ± 0.05	0.40 ± 0.07	0.37 ± 0.06	0.43 ± 0.04

Tableau 24 : Résultats des diamètres des canaux d'interconnexion des céramiques B1 à B7

Seuls les D50 de type mésoporeux ou microporeux sont pris en compte. Les valeurs des D50 pour les céramiques B1 à B7 ne sont pas significativement différentes (graphique 12).



Graphique 12 : diamètres des canaux d'interconnexion de la fraction mésoporeuse des céramiques B1 à B7

3.7- Modélisations Pore Core

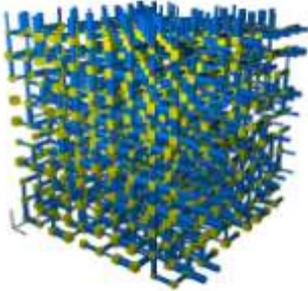
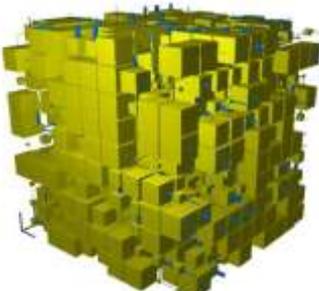
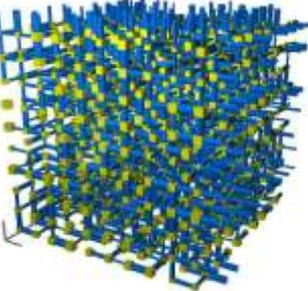
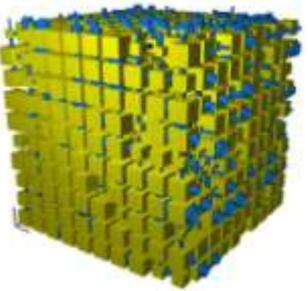
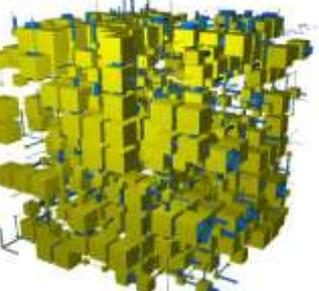
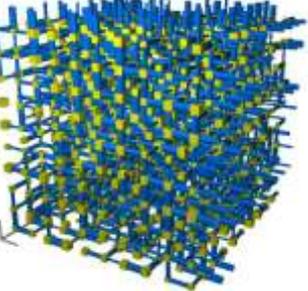
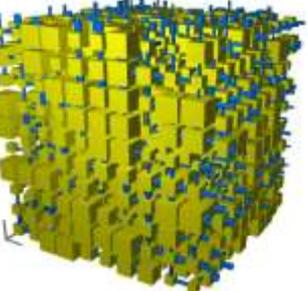
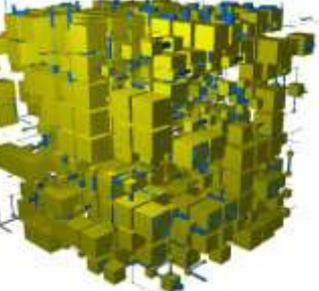
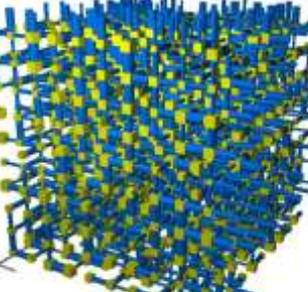
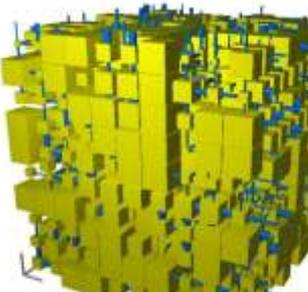
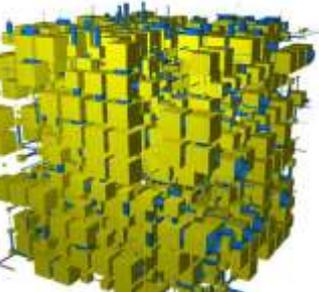
	Modélisation structure macroporeuse	Modélisation structure mésoporeuse	Modélisation structure microporeuse
B1		Non modélisable	
B2, B3			
B4, B5, B6			
B7			

Figure 57 : représentation des volumes poreux interconnectés des céramiques B1 à B7 selon le logiciel Pore Cor

4- Discussion

4.1- Optimisation de l'architecture poreuse :

L'objectif de cette partie est d'optimiser l'architecture poreuse interconnectée par la recherche du meilleur rapport entre le naphthalène et le saccharose. Si l'on considère les résultats de perméabilité en valeur absolue, la meilleure céramique est B7 et l'on constate une augmentation continue de la perméabilité parallèlement à l'augmentation de la proportion en saccharose (la céramique B1 est 1600 fois moins perméable que B7. Le niveau d'interconnexion va donc de pair avec la proportion de saccharose incorporé à la formule initiale. Les céramiques B6 et B7 sont en revanche extrêmement fragiles et de nombreuses fractures sont observées.

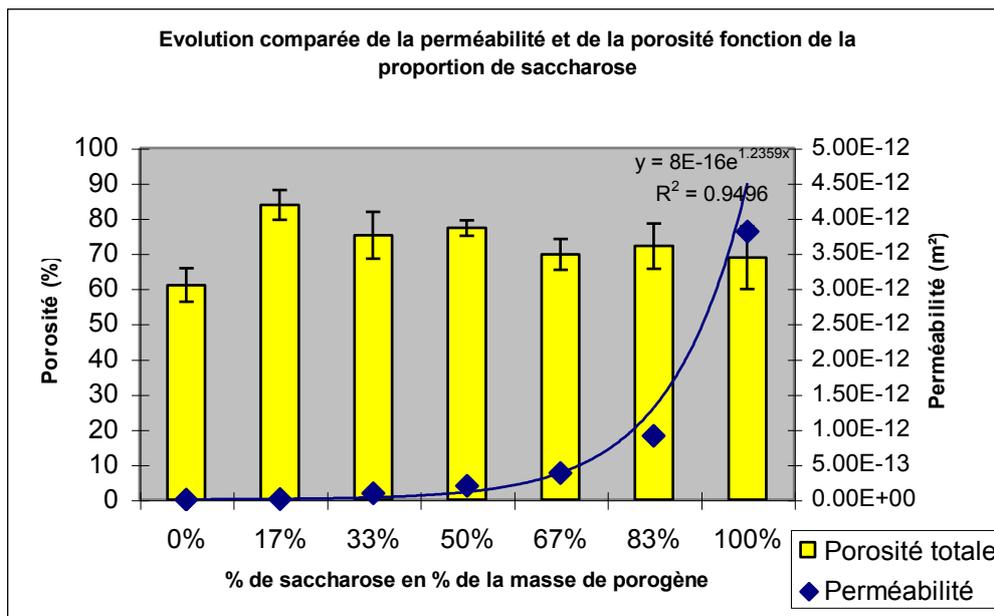
Ce constat illustre le nécessaire équilibre entre une architecture poreuse interconnectée et les autres paramètres de qualité d'une céramique en tête desquels se situe la résistance mécanique. Plutôt que de désigner une céramique comme étant la plus performante du point de vue de son architecture poreuse interconnectée, il semble donc plus pertinent de tenter de comprendre les mécanismes à l'origine de la création d'une architecture poreuse interconnectée afin de mieux les maîtriser.

4.2- Naphtalène et saccharose : quel impact sur l'architecture poreuse ?

4.2.1- Une association synergique

L'association naphthalène / saccharose s'avère synergique sur plusieurs points.

Tout d'abord pour la création d'une architecture poreuse interconnectée comme en témoigne l'évolution de la perméabilité fonction de la proportion relative en saccharose (graphique 13)

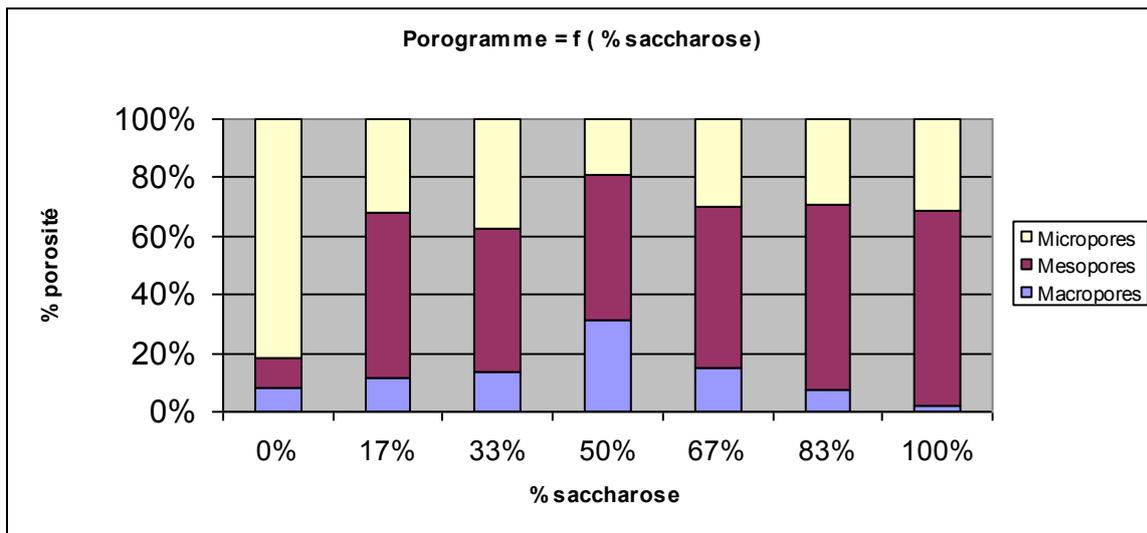


Graphique 13 : Evolution comparée de la perméabilité et de la porosité fonction de la proportion de saccharose

Plutôt que de parler « d'effet seuil » relatif à la quantité de saccharose dans la formulation de BCP, il serait donc plus pertinent d'évoquer une relation exponentielle entre cette même quantité de saccharose et la perméabilité de la céramique.

L'augmentation de la perméabilité au fur et à mesure de l'augmentation de la proportion de saccharose se fait sans modification significative de la porosité totale. Le saccharose utilisé en association possède donc non seulement des propriétés porogènes mais aussi des propriétés interconnectantes.

Tout comme pour les céramiques A1 à A8, l'augmentation de la perméabilité des céramiques B1 à B7 est à mettre en relation avec l'augmentation de la proportion des mésopores comme en atteste le graphique 14.



Graphique 14 : Evolution des porogrammes des céramiques fonction de l'évolution de la proportion de saccharose

Un faible ajout de saccharose (1 part de saccharose pour 5 parts de naphthalène) se traduit par une forte augmentation des mésopores dont la proportion est multipliée par 6. Ce niveau de 50 à 60 % de mésopores est ensuite maintenu constant quelle que soit la proportion de saccharose associée au naphthalène. En d'autres termes, il n'existe pas de corrélation stricte mésoporosité/perméabilité fonction du % de saccharose.

4.2.2- Mode de création de l'interconnexion

A partir des résultats et des constats précédemment établis il est possible d'émettre une hypothèse sur les comportements respectifs du saccharose et du naphthalène utilisés isolément ou en association :

4.2.2.1- Céramique formulée à partir de naphthalène :

Le naphthalène est éliminé par sublimation par traitement thermique à 80°C. Chacun des grains laisse ainsi place à un volume poreux dont la dimension est fonction de la granulométrie de la poudre de départ.

Le réseau mésoporeux est peu développé.

Le réseau microporeux est important et permet l'élimination des vapeurs de naphthalène.

L'interconnexion de nature macroporeuse et mésoporeuse est très faible et l'interconnexion est en majorité assurée par des micropores.

4.2.2.2- Céramiques formulées à partir d'un mélange naphthalène/saccharose:

Céramiques formulées à partir d'une faible proportion en saccharose (jusqu'à 33 % du porogène total)

L'élimination du naphthalène se fait dans les mêmes conditions que dans les cas précédents.

Le saccharose fond lors du plateau à 190°C. Ce phénomène se poursuit lors de la montée en température par une ébullition du saccharose fondu et enfin par l'élimination totale de tout résidu carboné par calcination.

Le saccharose en fusion à l'état semi-liquide tend à envahir les espaces laissés vacants par les grains de naphthalène qui ont été éliminés par sublimation. Quelques fractures de la matrice, résultat du phénomène d'élimination du saccharose par ébullition, peuvent survenir entre deux pores voisins et sont à l'origine de la création d'un réseau micro-mésoporeux non encore totalement interconnecté avec pour conséquence une perméabilité encore relativement faible mais déjà une prédominance d'une porosité de nature mésoporeuse. La proportion des macropores et des micropores tend à diminuer.

Céramiques formulées à partir d'une proportion en saccharose prédominante (de 50 % à 83 % du porogène total)

Le naphthalène est éliminé par sublimation par traitement thermique à 80°C. Les macropores sont en bien plus faible quantité étant donné la diminution de la proportion en naphthalène au profit du saccharose.

Le saccharose en fusion envahit les espaces vides laissés par les grains de naphthalène mais l'effet « vase d'expansion » offert par les macropores est insuffisant dû au rapport N/S défavorable. Il peut en résulter une fragilisation de la structure de la matrice phosphocalcique suivi d'une rupture à grande échelle des « cloisons » entre les pores résultat de l'action combinée de l'ébullition du « caramel » et de l'augmentation de pression localisée due aux gaz qui s'échappent. Une des conséquences de ce phénomène est la création d'un réseau poreux interconnecté de nature mésoporeuse responsable d'une forte perméabilité de la céramique.

Céramique formulée à partir de saccharose

Le saccharose en ébullition ne peut s'éliminer facilement. Une partie peut être éliminée par percolation au travers du réseau poreux du futur bloc de céramique. L'autre partie, faute de macropores libérés par les grains de naphthalène, est à l'origine de nombreuses fractures de la céramique. Il en résulte une céramique dégradée, facturée et difficile à manipuler dont la perméabilité est élevée.

4.3- Conclusion

La fabrication de céramiques dont les proportions de saccharose sont de 0, 17, 33, 50, 66, 83 et 100% a permis de dégager des pistes d'amélioration de l'architecture poreuse interconnectée :

- l'adjonction de saccharose permet le développement d'un réseau de pores dont le diamètre est compris entre 20 et 30 μm .
- L'augmentation de la proportion de saccharose va de pair avec une augmentation de la perméabilité sans qu'il y ait de modification de la porosité totale ou des porogrammes des céramiques.
- D'un point de vue pratique, si l'augmentation de la proportion de saccharose est bénéfique pour l'obtention d'une forte perméabilité, en revanche d'autres

caractéristiques notamment mécaniques peuvent en souffrir et rendre l'échantillon inutilisable.

Enfin, l'analyse de ces 7 céramiques à proportion gradée en saccharose a permis de proposer une hypothèse quant aux mécanismes impliqués expliquant la synergie de ces deux porogènes pour l'obtention d'une céramique à architecture poreuse interconnectée.

Le naphthalène pourrait ainsi offrir des espaces vides (macropores) après élimination par sublimation qui seraient envahis par le saccharose en ébullition. L'interconnexion mésoporeuse entre les pores étant liée à la rupture des cloisons phosphocalciques entre deux pores adjacents conséquence des contraintes de l'ébullition et de l'accumulation des gaz dans un espace fermé.

Partie 5 : Evaluation et optimisation de la cytocompatibilité d'une céramique à architecture poreuse interconnectée (A4)

Une étude de la cytocompatibilité de la céramique « A4 », échantillon qui présente le meilleur compromis entre une tenue mécanique satisfaisante et une interconnexion élevée, a été menée. Le MBCP® est une céramique phosphocalcique biphasée couramment utilisée en chirurgie réparatrice osseuse qui possède des caractéristiques physico-chimiques et des caractéristiques de formulation communes avec A4 (utilisation du porogène « naphthalène », frittage,...). L'étude de la cytocompatibilité de ce biomatériau « étalon » a permis de vérifier la cohérence des résultats obtenus pour la céramique A4.

Les propriétés de porosité et d'interconnexion ne laissent pas présager du comportement biologique d'une céramique *in vitro* ou *in vivo*. De nombreux phénomènes peuvent favoriser ou au contraire rendre toute prolifération ou même survie cellulaire impossible. Au premier de ces phénomènes *les échanges ioniques entre la matrice et le milieu de culture* avec l'instauration d'équilibres chimiques par dissolution et/ou précipitation au contact de la matrice, *la dégradation de cette dernière aboutissant à la formation de micro particules* qui sont phagocytées, et *l'aspect de surface du biomatériau* favorisant ou non l'adhésion des cellules.

La cytocompatibilité a été évaluée en suivant les recommandations de la norme NF EN 10993-5 (123) relative aux essais concernant la toxicité *in vitro* des dispositifs médicaux. Elle définit notamment les conditions de préparation des échantillons, les contrôles devant être employés ainsi que les lignées cellulaires et milieux de culture à utiliser.

Deux types d'essais de toxicité ont été menés :

- des essais en contact direct avec le biomatériau (paragraphe 8.3 de la norme)
- des essais en contact indirect par diffusion au travers d'un filtre (paragraphe 8.4.2 de la norme)

Les cellules utilisées sont des cellules adhérentes de moelle osseuse ou cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules pluripotentes sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires. Elles ont aussi la particularité d'être adhérentes à la surface plastique et peuvent donc être cultivées *in vitro* (11), (62), (63), (134).

Le but de cette partie est d'évaluer la « cytocompatibilité » *in vitro* de la céramique A4. L'objectif ultime étant pour ce biomatériau à architecture poreuse optimisée d'être utilisé comme support de cellules osseuses et former un matériau hybride utilisable en ingénierie tissulaire (59), (76), (85), (93), (95), (109), (127), (145).

1- Etude de la cytocompatibilité *in vitro* de la céramique A4

1.1- Matériels et méthodes:

1.1.1- Granules de céramiques

Les biomatériaux utilisés sont la céramique A4 et le MBCP®. Ces céramiques ont été utilisées sous la forme de granules de 1 à 2 mm qui ont été traités par ultrasons dans une cuve remplie d'alcool à 95°. Ce traitement par ultrasons a été appliqué tant que les granules de céramique « relarguaient » des micro-particules (troublant l'alcool à 95°). Les granules ont ensuite été séchés à l'étuve à 80°C pendant 24h puis aliquotés dans des tubes ependorff à raison de 50, 100 et 200 mg par tube. L'ensemble est ensuite stérilisé à la chaleur humide (121°C – 30 minutes).

1.1.2- Le milieu de culture

Le milieu choisi pour la culture est le α MEM (Minimum Eagle Medium) (GIBCO®). Il est supplémenté avec :

- 1% d'une solution de pénicilline (100 U/ml) streptomycine (100 μ g/ml) (GIBCO®),
- 1% d'une solution contenant un acide aminé essentiel : la L-glutamine (SIGMA®) (L-glu),
- 10% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutcher®) (SVF).

1.1.3- Le support (plastique) de culture

1.1.3.1- En absence de granules de MBCP® ou de A4 (phase d'amplification des cellules)

Des boîtes « Falcon 75 » (F75) munies d'un bouchon permettant les échanges gazeux ont été utilisées. Leur surface de 75 cm², est « pré-traitée » pour favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules.

1.1.3.2- En présence du MBCP® ou de A4 (étude de cytocompatibilité)

Des plaques 24 puits (Corning®) dont la surface a été traitée ont été utilisées pour les essais par contact direct avec les granules de céramique. Les cellules peuvent donc adhérer au plastique ou aux granules de céramique.

Des plaques 24 puits munies du dispositif Transwell® (Corning®) ont été utilisées pour les essais en contact indirect par diffusion au travers d'un filtre.

Le dispositif Transwell® permet dans une boîte de culture cellulaire modifiée d'isoler les cellules des granules de biomatériaux grâce à un « panier » contenant les granules. Le fond de ce « panier » est doté d'une fine membrane dont la maille est de 5µm. Les échanges ioniques entre la matrice et le milieu (dissolution à partir de la matrice,...) sont donc possibles bien que les granules soient isolés des cellules.

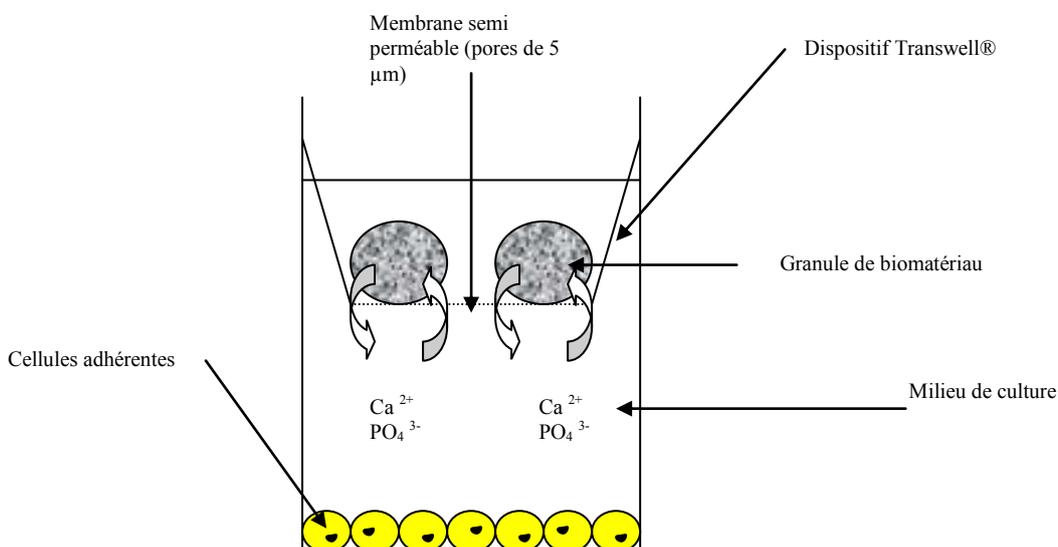


Figure 58 : Puits de culture doté du dispositif Transwell®

1.1.2- Cultures cellulaires

Les cellules sont obtenues à partir de prélèvement de moelle osseuse de fémurs de rat. Les rats sont des Lewis 1 A, mâles, consanguins. Ils sont anesthésiés par inhalation d'Isofluorane et l'euthanasie est réalisée par élongation de la colonne vertébrale. Les fémurs sont rapidement prélevés, disséqués et la moelle est « flushée ». La suspension recueillie est filtrée avant d'être centrifugée (1200 tours/min, 37°C, 8 minutes). Le culot est remis en suspension dans 5 ml de milieu de culture frais avant une nouvelle centrifugation (conditions identiques). Le culot est ensuite repris dans 5ml de milieu frais permettant l'ensemencement d'une boîte F75 et le volume de milieu est complété à 15 ml. La boîte est enfin placée dans l'incubateur (37 °C / atmosphère humide / 5 % de CO₂).

1.1.3- Amplification cellulaire

L'amplification cellulaire permet d'obtenir, par mitoses, un nombre suffisant de cellules pour réaliser l'expérience. Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine (tous les 2 à 3 jours). Les cellules sont observées au microscope à contraste de phase pour vérifier l'absence de contamination bactérienne ou fongique.

1.1.4- Comptage cellulaire

Le premier comptage est effectué le jour de la mise en culture. Il s'agit de déterminer le nombre total de cellules nucléées dans la moelle prélevée. Cela se fait à l'aide d'une cellule de Malassez en utilisant la méthode d'exclusion des cellules mortes par coloration au bleu de Trypan.

1.1.5- Mise en culture des cellules sur la matrice phosphocalcique

Au terme de 14 jours d'amplification, les cellules adhérentes sont détachées à l'aide d'un mélange trypsine / EDTA. Un comptage cellulaire est réalisé et la concentration cellulaire est

ajustée à l'aide de milieu de culture à 50.000 cellules/ml. 1ml de cette suspension est distribué dans chacun des puits de culture.

1.1.6- Evaluation de la viabilité cellulaire (test MTS) :

La viabilité cellulaire est évaluée après 7 jours de culture.

Matériels utilisés

- Méthyle Tetrazolium Salt (MTS) (Cell Titer 96 MTS, Promega corporation, Madison, WI).
- Phényle Méthyle Sulfoxyde (PMS) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).

La viabilité cellulaire est évaluée par le biais de la mesure de l'activité mitochondriale déshydrogénase NADH/NADPH dépendante résultant de la conversion du sel de tétrazolium en formazan par oxydation. Le suivi par spectrophotométrie de la concentration en formazan à 490 nm permet la détermination de la viabilité cellulaire.

Les modalités de la réalisation pratique de cette mesure sont détaillées dans l'annexe 8.

1.1.7- Analyse statistique :

Chaque expérience est répétée deux fois et les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- l'écart type des six mesures. Une comparaison des moyennes est réalisée à l'aide du test ANOVA suivi du test de Student.

1.2- Résultats :

1.2.1- Paramètres de porosité :

Les caractéristiques de porosité mesurées par porosimétrie à mercure sont données par le tableau 26.

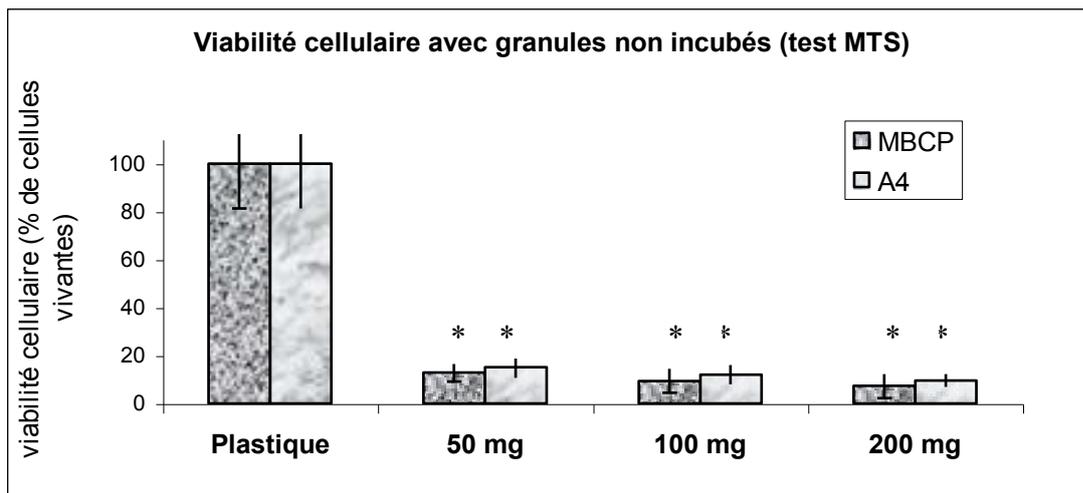
	Porosité (%)				surface spécifique (m ² /g)
	Total e	Macropores	Mesopores	Micropores	
MBCP®	64.2 ± 6.2	11.5 ± 2.1	11.9 ± 3.2	76.6 ± 8.2	15.6 ± 4.1
A4	74.1 ± 7.0	10,3 ± 1.1	60.6 ± 3.5	29.0 ± 3.8	14.8 ± 4.1

Tableau 26 : caractéristiques de porosité des granules de céramique A4 et MBCP

Les porosités totales des céramiques A4 et MBCP® ne sont pas significativement différentes. L'étude des porogrammes révèle que la répartition en macro, méso et micropores est en revanche très différente entre ces deux biomatériaux. La céramique A4 possède une structure majoritairement mésoporeuse et fortement interconnectée. En revanche, la céramique MBCP® est dotée d'une porosité à dominante macro et microporeuse dont l'interconnexion est essentiellement de nature microporeuse.

1.2.2- Etude de la viabilité cellulaire en présence d'A4 (étalon MBCP®)

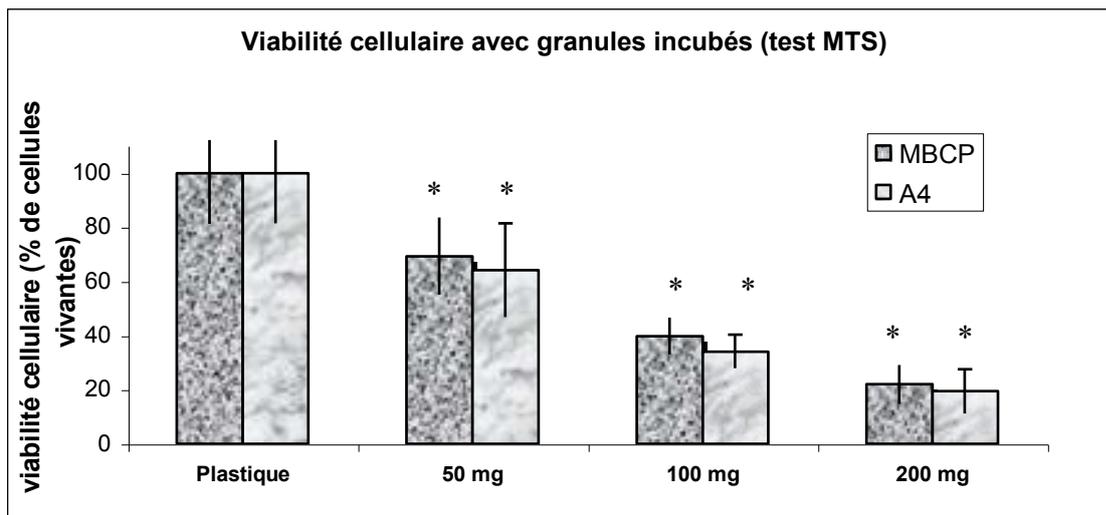
Le « témoin plastique » est un contrôle positif qui représente 100 % de survie cellulaire. Les résultats obtenus montrent une faible survie cellulaire au contact des granules de céramique A4 et MBCP® (graphique 15). Les pourcentages de survie cellulaire ne dépassent pas 15 % dans les conditions les plus favorables. Les deux céramiques étudiées semblent donc présenter une toxicité vis à vis des cellules adhérentes de moelle de fémur de rat. Cet effet est notable dès la plus petite quantité de granules (50mg/1ml de milieu) introduite dans le puits de culture. La viabilité cellulaire est identique pour les granules incubés en présence de A4 et de MBCP®.



Graphique 15 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules non préincubés). * : différence significative ($p < 0.05$)

Les granules de céramique étudiés ne sont donc pas directement utilisables *in vitro* ce qui justifie la pratique de l'incubation des granules de céramiques dans du milieu de culture pendant une durée de 3 à 5 jours avec un changement de milieu quotidien. Cette étape d'incubation préalable à la mise en culture et largement utilisée lors des expérimentations *in vitro* n'est que très rarement signalée dans la littérature. Il est à souligner que cette toxicité des granules n'est pas constatée *in vivo*, probable conséquence de l'effet tampon des fluides biologiques.

La même expérience a été menée en préincubant pendant 5 jours les granules de A4 et de MBCP® en présence de 1ml de milieu de culture α -MEM renouvelé quotidiennement. Les autres modalités techniques expérimentales restant identiques. Les résultats sont présentés dans le graphique 16.



Graphique 16 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules incubés). * : différence significative ($p < 0.05$).

Il est intéressant de constater que la préincubation des granules en présence de milieu de culture a eu pour effet de multiplier par un facteur 4 à 5 les pourcentages de survie cellulaire. La survie dépasse 60% pour les puits « 50mg de granules » pour A4 ou de MBCP® à comparer aux 12 à 15% pour la même quantité de granules non incubés.

L'objectif initial qui était de proposer une céramique directement utilisable pour l'ingénierie tissulaire n'est donc que partiellement rempli car les granules de céramique A4 ne sont utilisables que sous réserve d'une préincubation longue dans le milieu de culture.

Plusieurs phénomènes, conséquence de l'interaction entre la matrice phosphocalcique et le milieu de culture, peuvent expliquer la toxicité observée sur les céramiques non incubées (95), (107) :

- les échanges ioniques (ions hydrogène, calcium, phosphate) entre la matrice et le milieu par dissolution de la matrice et/ou (re)précipitation à sa surface
- la dégradation de la matrice phosphocalcique aboutissant à la formation de microparticules de céramiques dont la phagocytose par les cellules adhérentes peut être toxique
- l'état de surface (surface lisse,...) de la matrice qui peut promouvoir ou au contraire limiter l'adhésion cellulaire.

L'identification et la connaissance de ces phénomènes potentiellement toxiques sont nécessaires pour modifier le processus de fabrication de A4 et améliorer sa cytocompatibilité.

2- identification des mécanismes de toxicité cellulaires de A4

2.1- Matériels et méthodes :

2.1.1- Matériels :

Des granules de MBCP® et d'A4 de caractéristiques similaires à ceux utilisés précédemment ont été utilisés.

2.1.2- Méthodes :

2.1.2.1- Mesure du pH :

La mesure du pH du milieu de culture a été réalisée à l'aide d'un pHmètre de marque Knick (modèle Portamess 910). Les valeurs des pH ont été relevées à t=0h, t=1h, t=4h et t=24h pour les masses de granules 50, 100 et 200mg. Les mesures ont concerné les granules de A4 ou de MBCP® placés dans des boîtes de culture de 24 puits mises à l'étuve à 37°C (+5% CO₂). Les résultats sont exprimés comme la moyenne +/- l'écart type des 4 mesures.

2.1.2.2- Mesure des concentration en calcium et en phosphate du milieu de culture :

La mesure des concentrations en ion calcium et phosphate du milieu baignant les granules a été réalisée sur un automate « Hitachi 917 ® blood analyzer® ».

La concentration en ion calcium a été mesurée à l'aide d'une technique colorimétrique complexométrique utilisant la phénolphthaléine (Sigma®).

La concentration en ion phosphate a été mesurée à l'aide d'une technique de mesure en point final utilisant le molybdate d'ammonium (kit Biorad®).

Les mesures ont été réalisées pour 3 concentrations de granules de A4 et de MBCP® (50, 100 et 200 mg) mis à incuber dans 1ml de milieu alpha MEM supplémenté en boîte de culture 24 puits placé dans une étuve à 37°C (+5% CO₂). Les résultats sont exprimés comme la moyenne de 3 mesures pour chaque condition opératoire. Les valeurs des concentrations en ion calcium et phosphate ont été mesurées à t=0, t=1h, t=24h et t=24h.

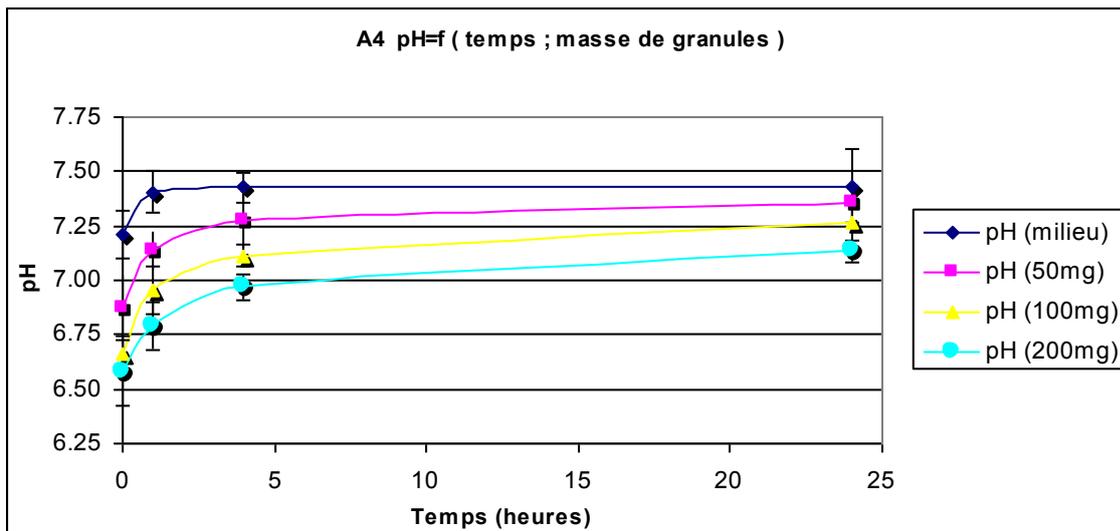
2.1.2.3- Test de viabilité cellulaire en contact indirect avec plaques 24 puits disposant du dispositif « Transwell® »

La concentration cellulaire utilisée est de 50.000 cellules par puits dans 1 ml de milieu α -MEM supplémenté. La masse de granules de A4 ou de MBCP® est de 50, 100 ou 200 mg / puits. L'effet de la préincubation des granules dans le milieu de culture a été étudié par l'utilisation de granules préincubés et non préincubés. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type de 6 mesures (la manipulation a été réalisée à deux reprises).

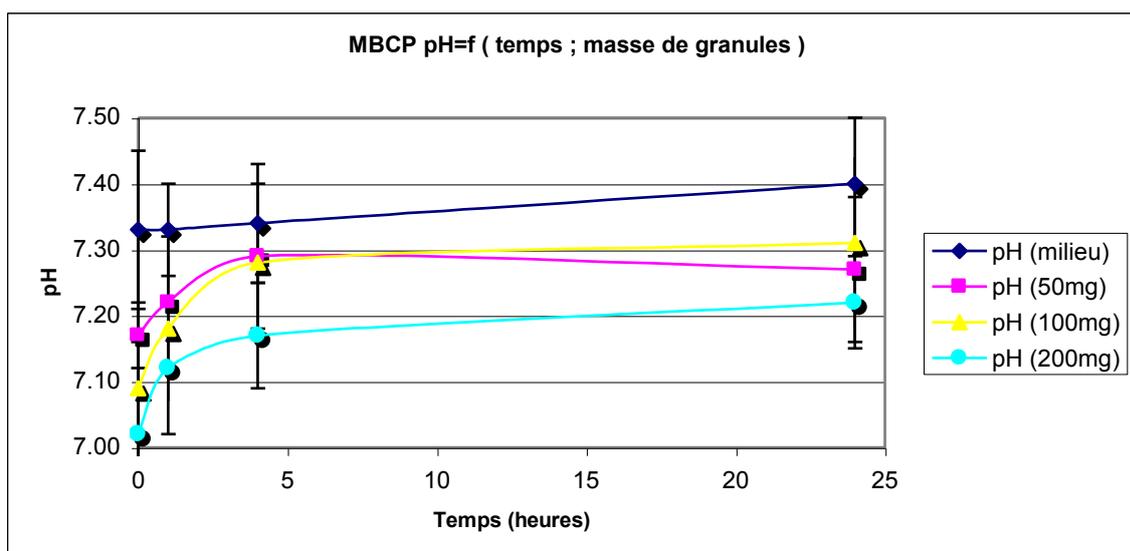
2.2- Résultats

2.2.1- Mesures du pH du milieu de culture

Immédiatement après introduction des granules de MBCP® ou de A4, le pH diminue légèrement (graphique 17 et 18). Cet effet est plus marqué pour le milieu baignant les granules de A4. Il est observé que cette baisse du pH est dose dépendante, ainsi le pH à t=0 pour 200mg de granules de A4 est de 6,62 versus 6,85 pour 50 mg de granules. Les valeurs des pH plafonnent très rapidement (après une heure d'incubation environ) à une valeur plateau qui est maintenue pendant 24h.



Graphique 17 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules non préincubés)

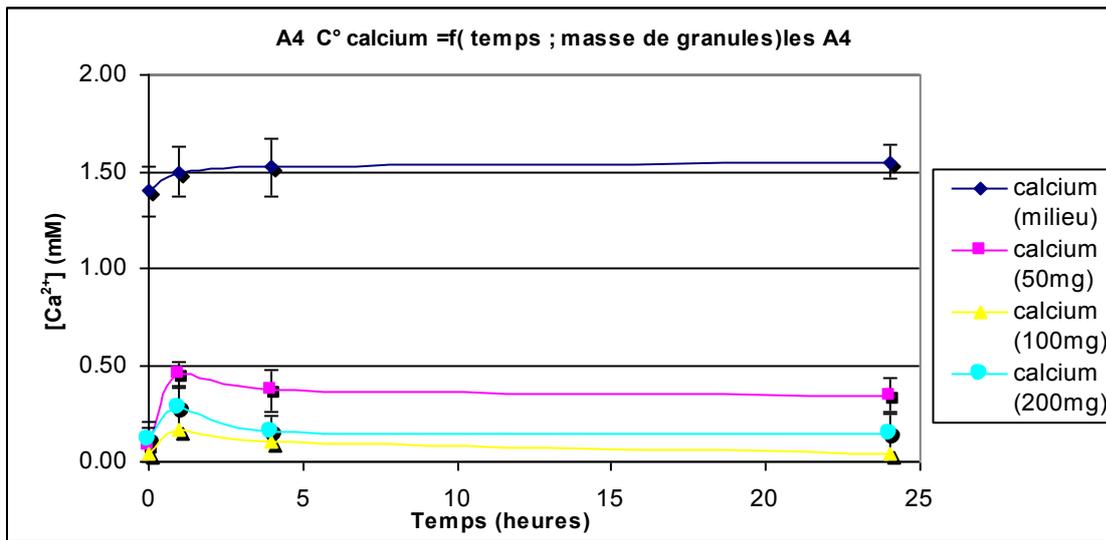


Graphique 18 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules non préincubés)

2.2.2- Mesure des concentrations en ion calcium et phosphate du milieu de culture:

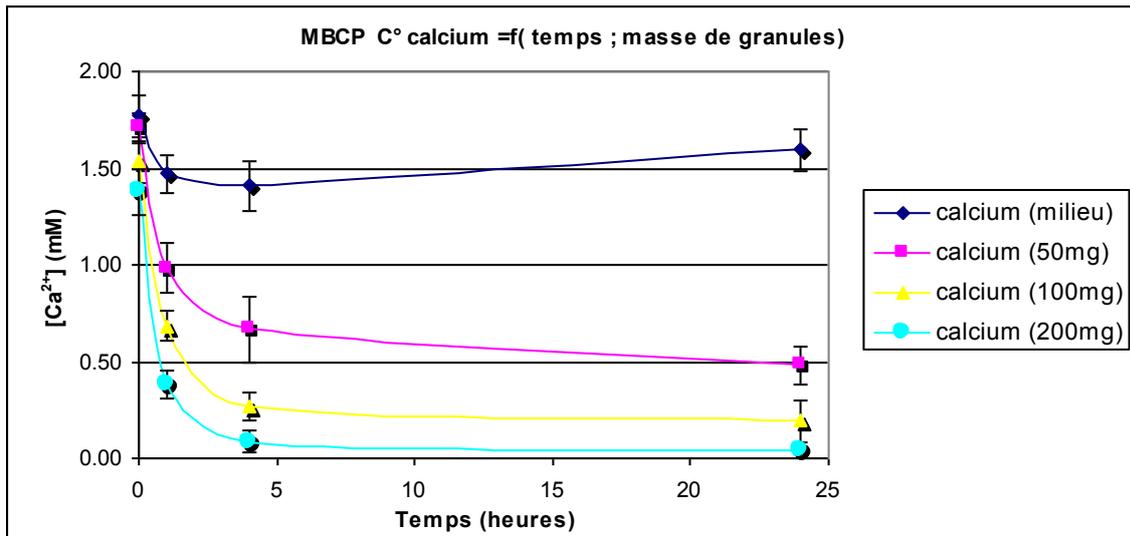
La concentration en ion calcium du milieu de culture diminue très fortement dès l'immersion des granules de A4 à une concentration d'environ 0,1 mM (graphique 19). Cette diminution de concentration à moins de 10% de la valeur initiale du milieu seul est suivi d'un effet rebond après 1h d'immersion. Une phase de stabilisation de la concentration de calcium

survient après 4h avec des valeurs comprises entre 0,15 et 0,38 mM selon la masse de granules introduite dans le puits de culture. Rappelons que la concentration du milieu seul se situe à environ 1,50 mM pour ce paramètre. La céramique A4 interagit donc fortement avec le milieu de culture et il se produit probablement un phénomène de précipitation à la surface de la matrice du biomatériau.



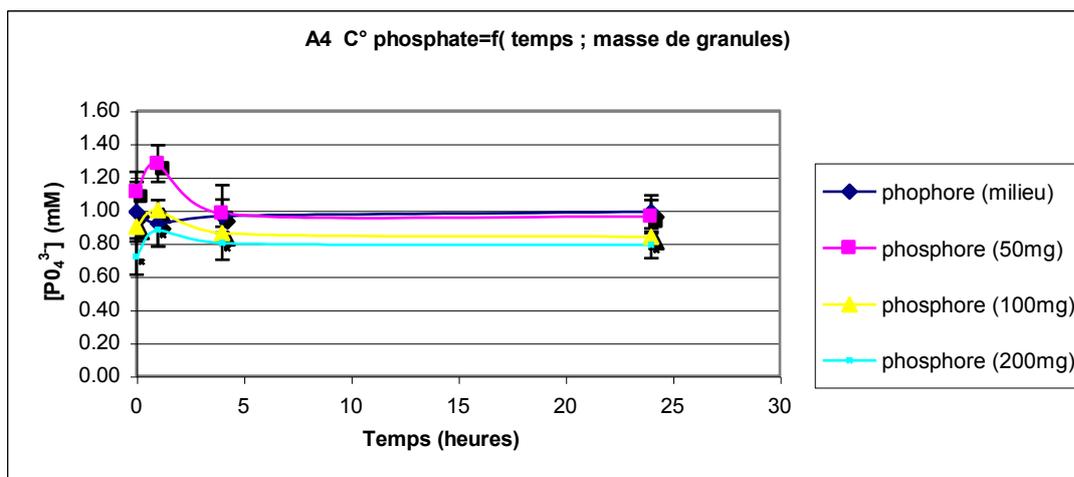
Graphique 19 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules non préincubés)

La concentration en calcium du milieu baignant les granules de MBCP® ne diminue pas immédiatement comme le témoigne le graphique 20. La déplétion en ion calcium du milieu de culture se fait progressivement pour se stabiliser au bout de quatre heures environ à une valeur de 0,50mM à 0,20mM selon la quantité de granules introduite dans le puits de culture. Il convient de noter que les valeurs des concentrations finales en phosphate après 24h d'immersion des granules sont assez similaires entre A4 et MBCP®.



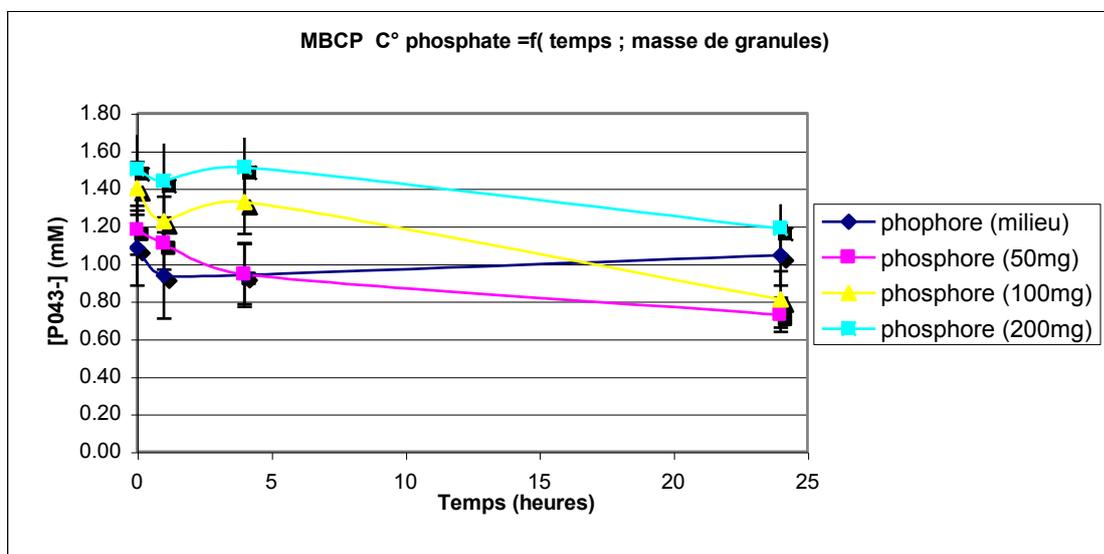
Graphique 20 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules non préincubés)

La concentration en ions phosphate du milieu de culture en contact avec les granules A4 augmente légèrement après une heure d'immersion (différence généralement non significative par rapport au témoin « milieu sans granule »). Un équilibre de la concentration de ce paramètre est observé dès la quatrième heure d'immersion et maintenu pendant les 24 heures de la mesure. Il n'existe pas de différence significative de concentration en ions phosphate entre le milieu baignant les granules de A4 et le milieu de culture seul. Il ne semble donc pas y avoir d'interaction notable entre la matrice de A4 et le milieu de culture concernant les ions phosphate.



Graphique 21 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules non préincubés)

De la même manière, on observe une relative stabilité de la concentration en ions phosphate du milieu de culture au contact de granules de MBCP comme en témoigne le graphique 22.



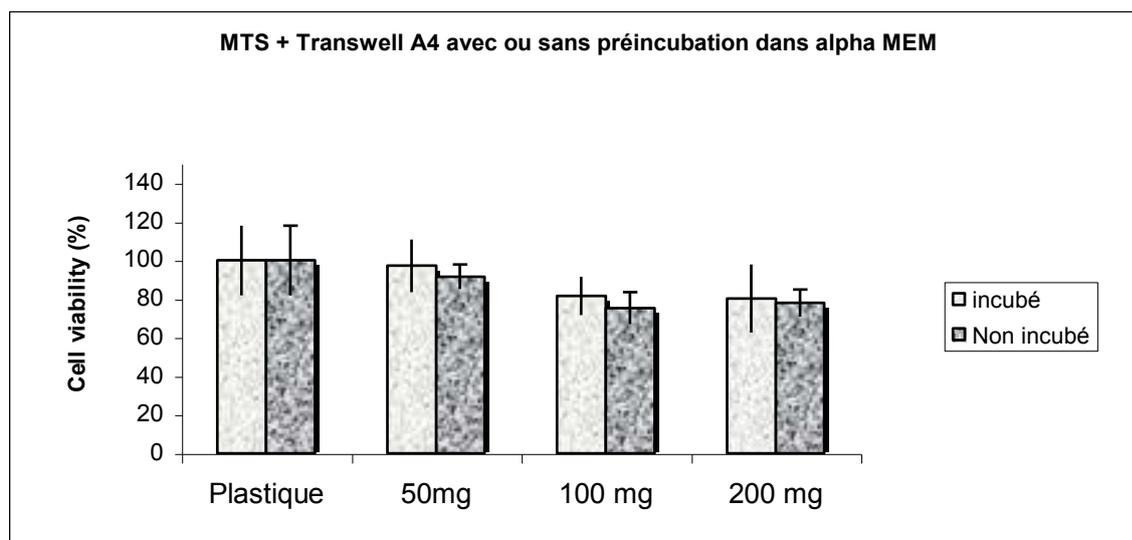
Graphique 22 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules non préincubés)

La faible viabilité cellulaire *in vitro*, de l'ordre de 12 à 15% dans les conditions de culture les plus favorables (50 mg de granules/puits de culture), pourrait donc être due à un phénomène de déplétion en calcium du milieu de culture par interaction avec la matrice phosphocalcique. Le degré d'implication de ce phénomène ne peut être en revanche déterminé avec précision car l'effet toxique dû aux microparticules susceptibles d'être phagocytées par les cellules et celui dû à un aspect de surface inadapté n'a pas été évalué.

2.2.3- Culture des cellules adhérentes en puits dotés du dispositif Transwell® :

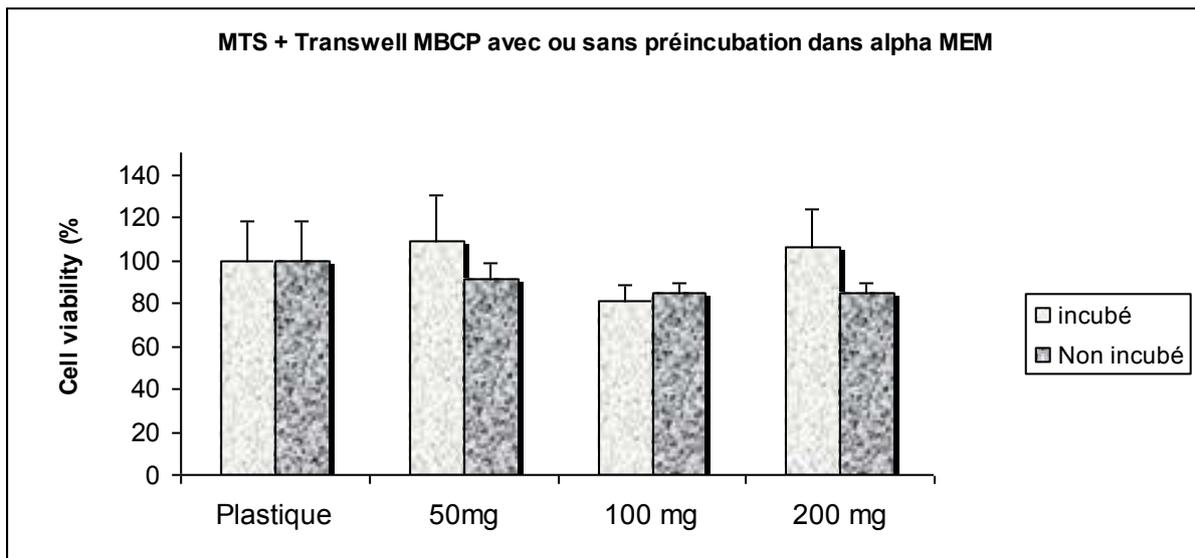
La mesure de la viabilité cellulaire réalisée à l'aide de boîtes de culture dont les puits sont dotés du dispositif Transwell® va permettre de distinguer la toxicité due aux interactions par contact direct avec la matrice phosphocalcique de la toxicité par contact indirect (dissolution à partir de la matrice, précipitation à la surface du biomatériau). La comparaison des graphiques 23 et 24 avec les graphiques 15 et 16 démontre que la toxicité observée sur les cellules adhérentes est une toxicité de contact avec la matrice phosphocalcique. La viabilité cellulaire des puits dotés du dispositif Transwell® contenant des granules de A4 ou de MBCP® n'est pas significativement différente de celle du témoin plastique (sans biomatériau). La toxicité

cellulaire est donc probablement une toxicité de contact due à l'état de surface inadapté à l'adhésion cellulaire car la membrane semi perméable du dispositif Transwell® « piège » toutes les particules de plus de 5 µm de diamètre et les empêche de sédimenter au fond du puits de culture et de rentrer au contact des cellules. La probabilité d'une toxicité due à la phagocytose des particules de moins de 5 µm qui auraient traversé la membrane semi perméable et sédimementé au fond du puits de culture est faible.



Graphique 23 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell

Les graphiques 23 et 24 montrent que la viabilité cellulaire des granules incubés et des granules non incubés est similaire lorsque les cellules ne peuvent pas rentrer en contact avec le biomatériau, argument supplémentaire en faveur d'une toxicité de contact plutôt que d'une toxicité par modification du milieu de culture à partir de la matrice phosphocalcique.



Graphique 24 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de MBCP incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell

Afin de permettre une utilisation extemporanée de la céramique A4 à des fins d'ingénierie tissulaire, il convient de diminuer la toxicité de contact de la matrice phosphocalcique. Le frittage à haute température pourrait permettre cette modification de l'état de surface favorisant par la même les phénomènes d'adhésion cellulaire ; la cytocompatibilité pourrait s'en trouver fortement améliorée.

3- Intérêt du frittage à 1200°C sur l'amélioration de la cytocompatibilité des granules de A4

L'objectif est d'étudier et de comparer la cytocompatibilité des céramiques A4 et MBCP® dont le frittage a été réalisé à 1200°C et de vérifier si ce traitement permet d'obtenir des biomatériaux utilisables extemporanément.

3.1- Matériels et méthodes:

3.1.1- Matériels

Les granules de A4 et de MBCP ont été frittés à 1050°C ou 1200°C. Toutes autres caractéristiques relatives aux biomatériaux restant identiques.

3.1.2- Méthodologie :

Les méthodologies d'analyse sont semblables à celles décrites dans les parties précédentes.

Un spectre par diffraction des rayons X a été réalisé sur les granules de A4 et de MBCP® frittés à 1050 et 1200°C pour vérifier l'absence de modification de la composition chimique due au traitement thermique.

De la même manière une mesure de la porosité totale, de la répartition en classes de pores et de la surface spécifique a été réalisée par porosimétrie à mercure selon la méthodologie précédemment décrite.

Enfin l'évaluation la cytocompatibilité des granules de A4 et MBCP® frittés à 1050 et 1200°C, incubés et non préincubés a été réalisée selon les modalités définies dans les paragraphes précédents. L'utilisation de boîtes de culture classiques et de boîtes dotées du dispositif Transwell® permettent d'évaluer la toxicité cellulaire par contact direct avec le biomatériau.

3.2- Résultats - Discussion

3.2.1- Caractéristiques des granules frittés à 1200°C

Le spectre de diffraction des rayons X présente un profil typique des BCP et le pourcentage d'HA et de β -TCP est conservé.

Le tableau 27 présente les caractéristiques de porosité des céramiques A4 et MBCP® frittées à 1050 et à 1200°C.

	porosité (%)				Surface spécifique (m ² /g)
	Totale	Macropores	Mesopores	Micropores	
MBCP® fritté à 1050 °C	64.2 ± 6.2	11.5 ± 2.1	11.9 ± 3.2	76.6 ± 8.2	15.6 ± 4.1
MBCP® fritté à 1200 °C	43.2 ± 3.9	32.5 ± 3.1	27.1 ± 4.7	40.4 ± 5.9	8.8 ± 3.2
A4 fritté à 1050 °C	74.1 ± 7.0	10,3 ± 1.1	60.6 ± 3.5	29.0 ± 3.8	14.8 ± 4.1
A4 fritté à 1200 °C	54.2 ± 5.7	15.2 ± 4.2	50.3 ± 6.3	32.5 ± 5.9	8.8 ± 3.2

Tableau 27 : caractéristiques de porosité des granules de céramique A4 et MBCP frittées à 1050 et 1200°C

Le traitement par frittage à haute température a pour conséquence une diminution de la porosité totale pour A4 comme pour MBCP®. Les mésopores de la céramique A4 et les micropores de la céramique MBCP® sont les classes de pores les plus affectées par ce traitement thermique avec une forte diminution de la proportion relative de ces tailles de pores. Les biomatériaux tendent ainsi à se densifier et la micro ou la mésoporosité diminue de manière importante. Il est observé en parallèle une diminution d'environ un facteur 2 de la surface spécifique.

Les porogramme de A4 (figure 59 et 60) attestent de cette modification ce qui se traduit par la diminution du pic de micropores aux alentours de 0.3-0.4 µm et une diminution des mésopores au profit d'une classe de micro-mésopores de taille très large de 0.2 à 80µm.

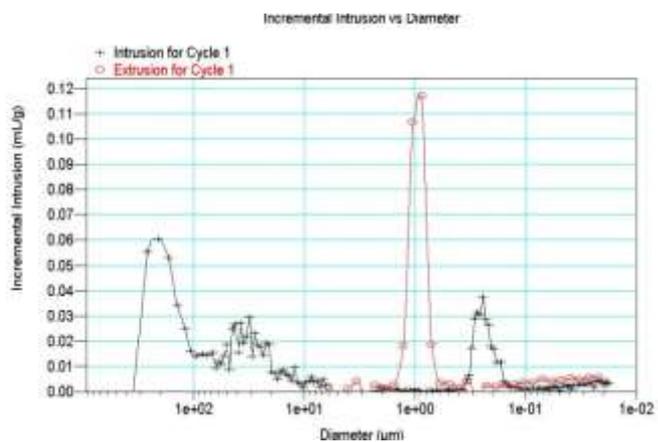


Figure 59 : Porogramme de A4 fritté à 1050°C

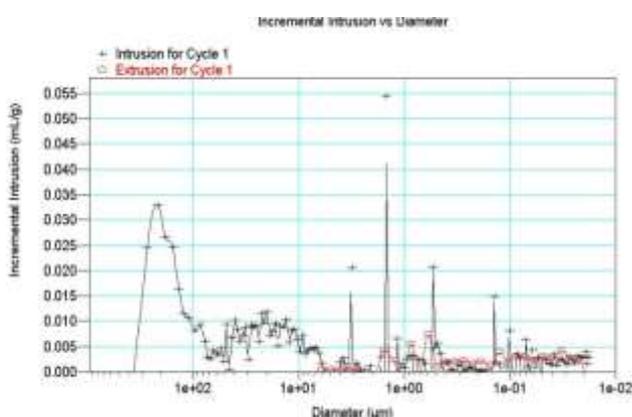


Figure 60 : Porogramme de A4 fritté à 1200°C

Les porogrammes de MBCP® (figure 61 et 62) présentent aussi une modification notable de la porosité avec une disparition du pic de micropores aux alentours de 0.3-0.4 µm et un remplacement par des micropores de taille « diffuse » de 0.02 à 10 µm.

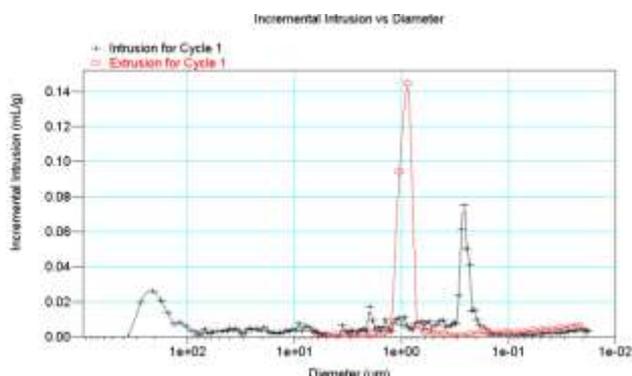


Figure 61 : Porogramme de MBCP fritté à 1050°C

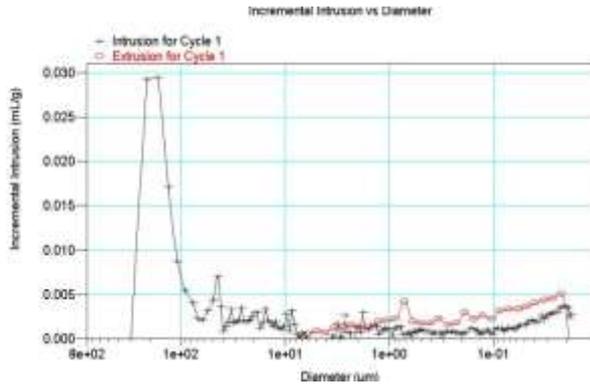
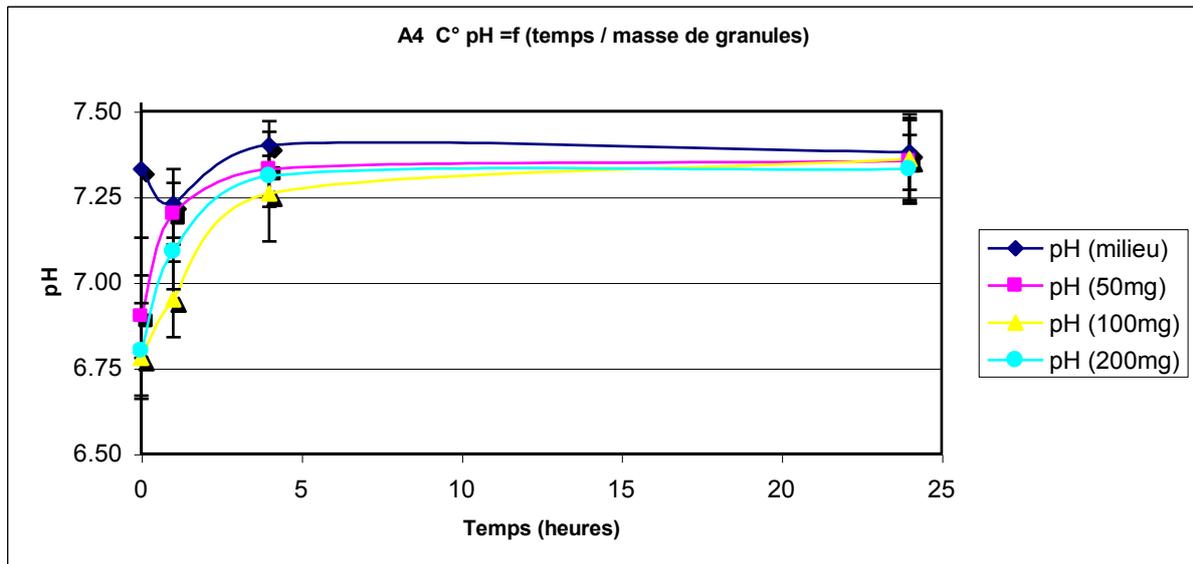


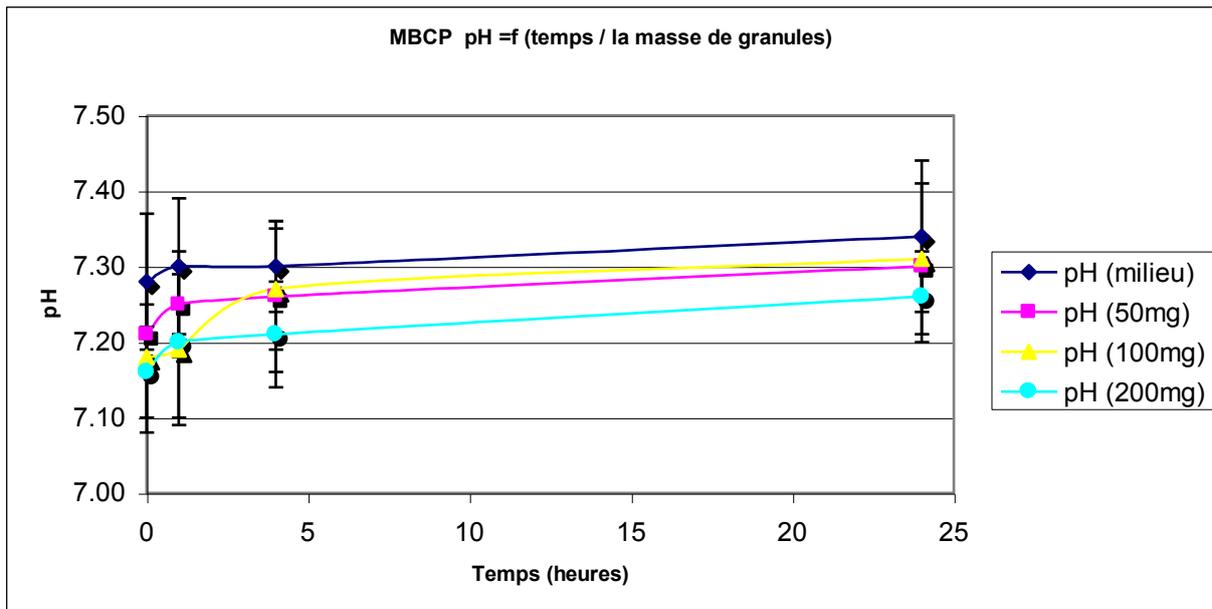
Figure 62 : Porogramme de MBCP fritté à 1200°C

3.2.2- Mesures du pH du milieu de culture

Après immersion des granules de A4 ou de MBCP® dans le milieu de culture, le pH diminue et cet effet « masse de granule » dépendant est plus marqué pour A4 que pour MBCP®. Les modifications du pH du milieu de culture sont cependant bien moins marquées que pour les céramiques frittées à 1050°C. Le traitement par frittage à 1200°C semble donc avoir « passivé » la céramique en diminuant ses capacités d'échange d'ion H⁺ avec le milieu de culture.



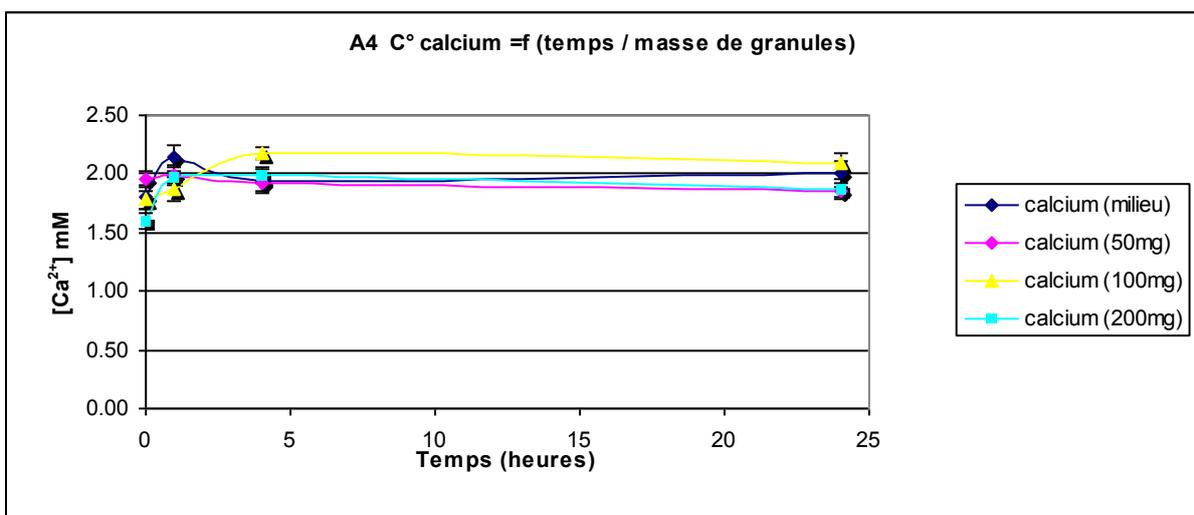
Graphique 25 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)



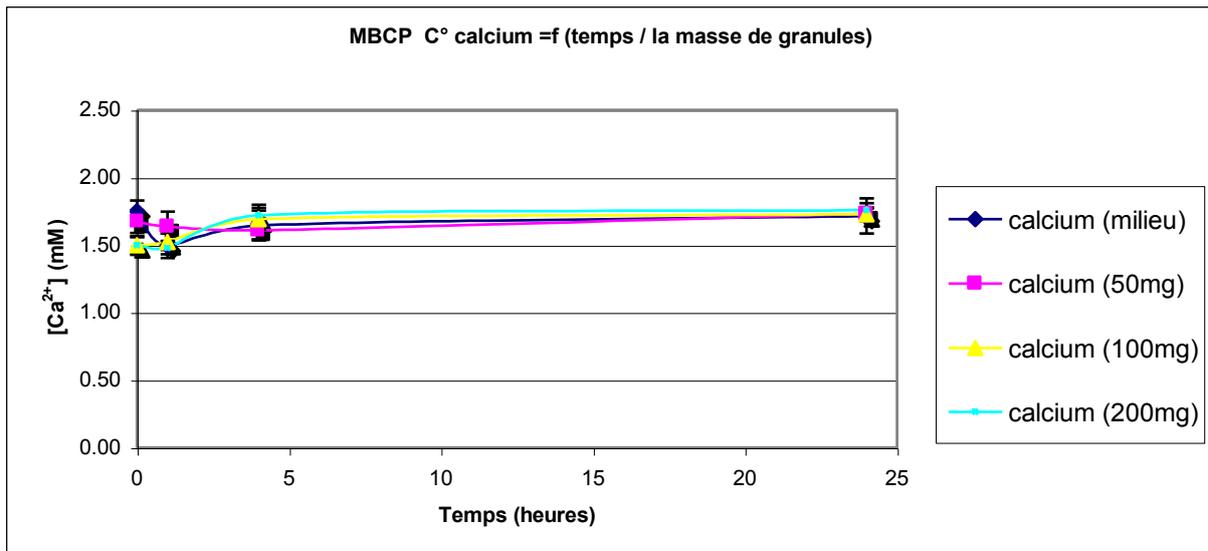
Graphique 26 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

3.2.3- Modification des concentrations du milieu de culture en ions calcium et phosphate :

La concentration en ions calcium du milieu α MEM supplémenté n'est pas modifiée par l'immersion des granules de A4 ou de MBCP®. Une concentration stable en calcium ionisé est observée aux alentours de 1.6 à 1.9 mM. Le frittage à 1200°C a totalement supprimé les capacités d'échange d'ions calcium et phosphate entre la matrice et le milieu de culture.

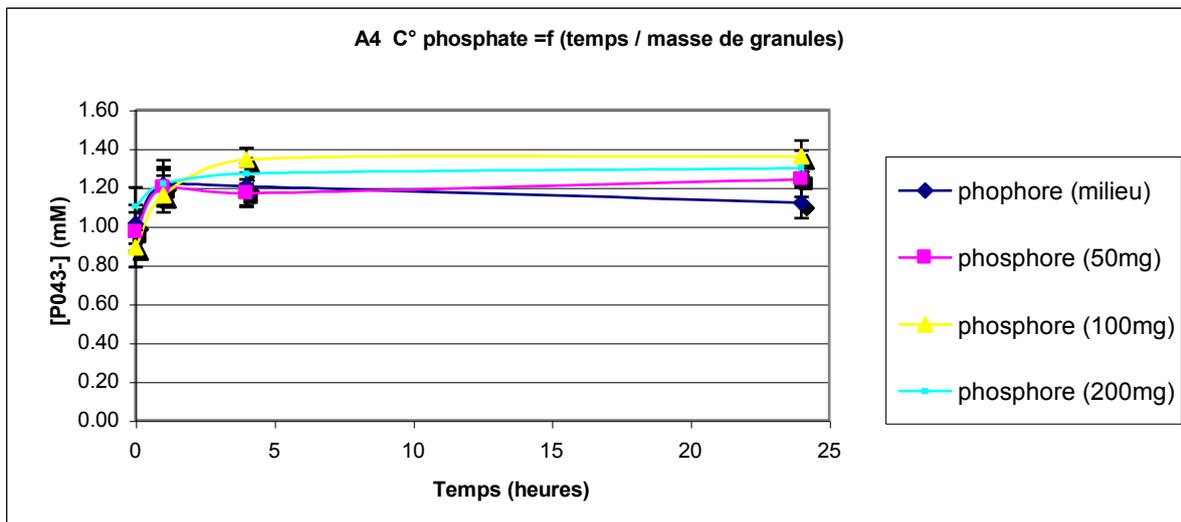


Graphique 27 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

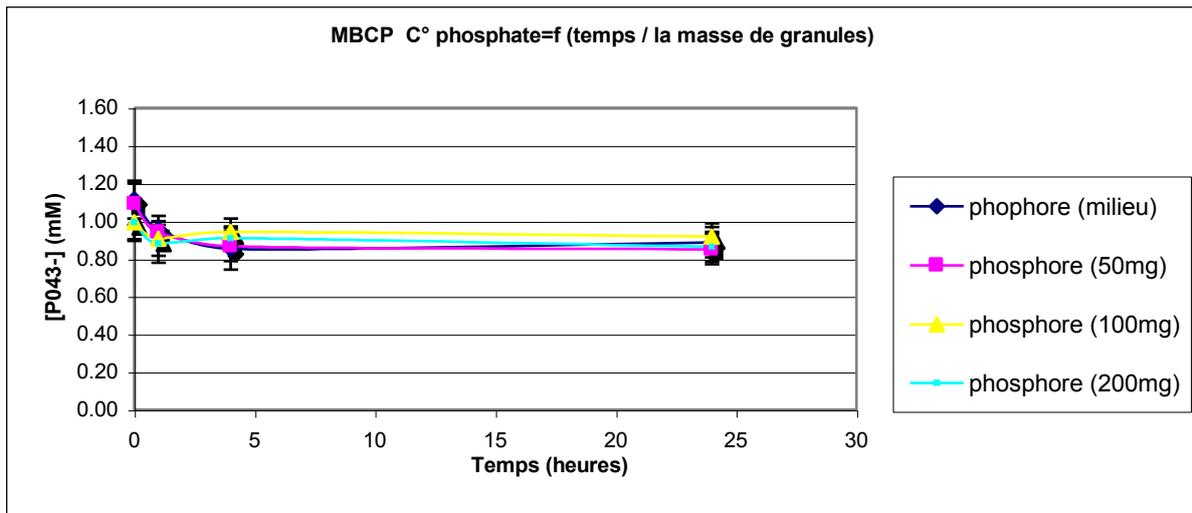


Graphique 28 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules frittés à 1200°C)

De la même manière, la concentration en ions phosphate du milieu α MEM supplémenté ne subit pas de modification majeure due à l'introduction de granules d'A4 ou de MBCP® dans le milieu de culture.



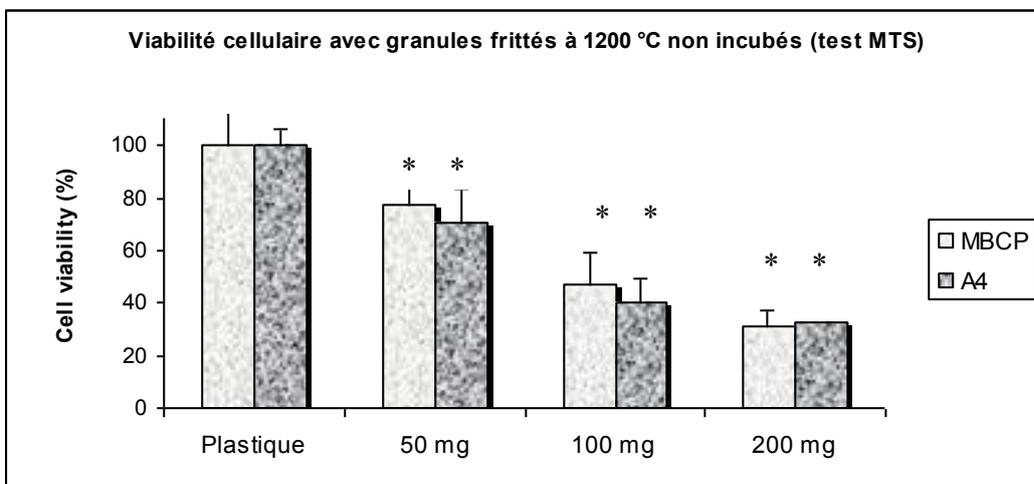
Graphique 29 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)



Graphique 30 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules frittés à 1200°C)

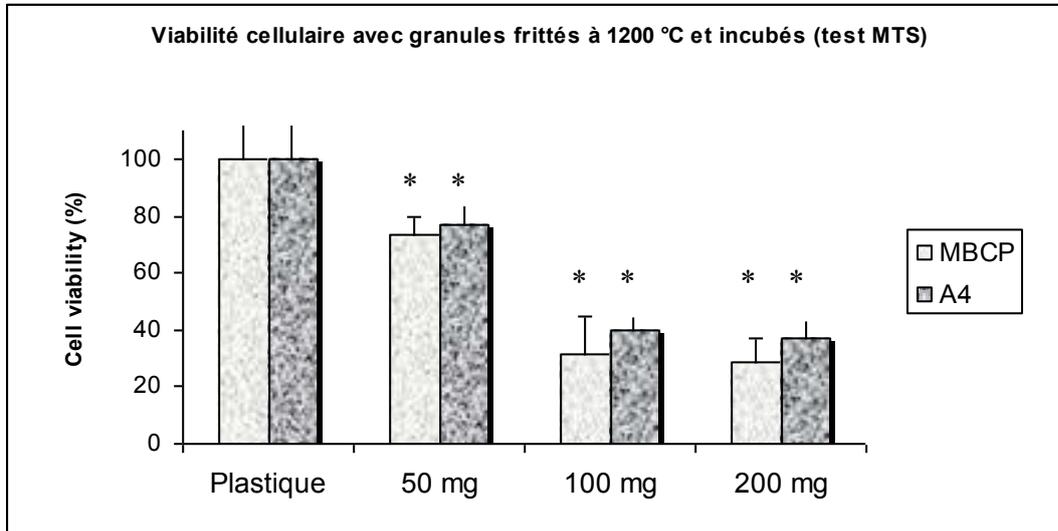
3.2.4- Test de viabilité cellulaire MTS au contact des granules

Les résultats de viabilité cellulaire des granules de céramique montrent une très nette augmentation de la viabilité des cellules au contact de granules non incubés pour A4 comme pour MBCP®. Les pourcentages de viabilité cellulaire pour ces deux céramiques sont de l'ordre de 30% de cellules viables dans la situation la plus défavorable (200 mg de granules par puits de culture), valeur significativement différente de celle observée pour des granules frittés à 1050°C où la viabilité cellulaire de A4 comme de MBCP® était inférieure à 9% dans les mêmes conditions.



Graphique 31 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules frittés à 1200°C et non incubés). * : différence significative ($p < 0.05$).

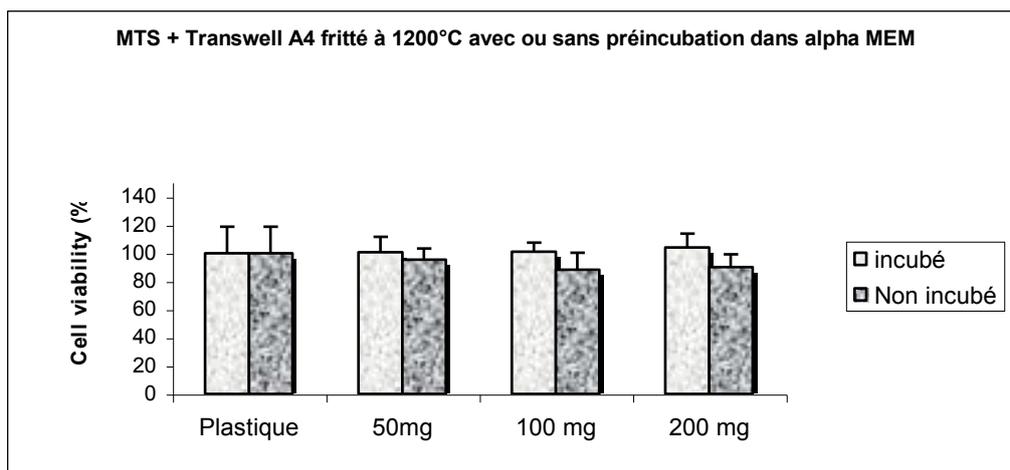
Il doit être souligné que la préincubation ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats de viabilité cellulaire. Le traitement thermique à 1200°C rend donc les granules de céramique A4 et MBCP® directement utilisables in vitro sans incubation en présence de milieu de culture.



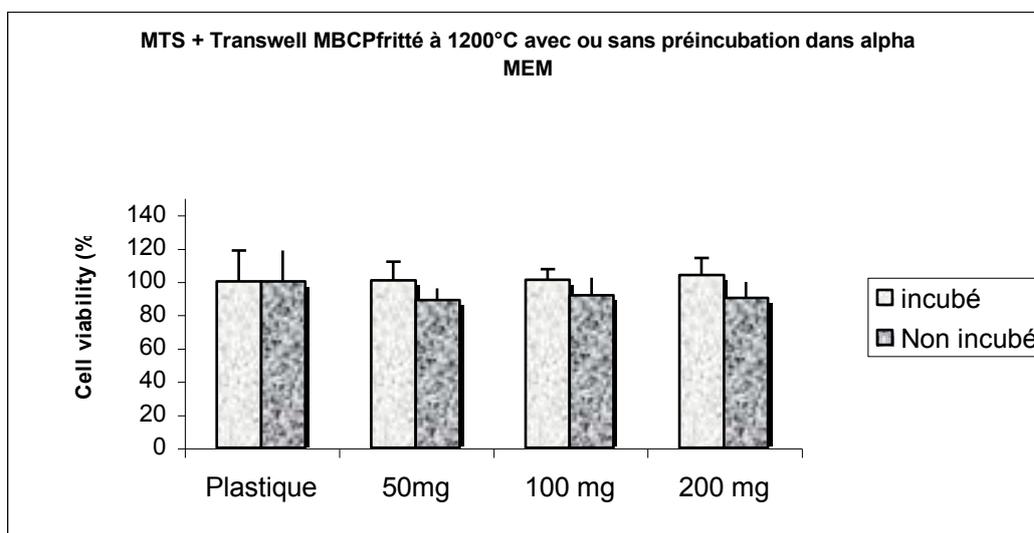
Graphique 32 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules frittés à 1200°C et incubés). * : différence significative ($p < 0.05$).

3.2.5- Etude du mode de toxicité cellulaire :

Les résultats de viabilité cellulaire des granules tenus à l'écart des cellules à l'aide du dispositif Transwell® confirment que la toxicité observée est essentiellement une toxicité de contact. Pour A4 comme pour MBCP®, il est observé une excellente viabilité cellulaire (>80%) quelle que soit la masse de granules introduite dans le puits de culture, qu'il y ait ou non préincubation en présence de milieu de culture.



Graphique 33 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell (granules frittées à 1200°C)



Graphique 34 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de MBCP incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell (granules frittées à 1200°C)

Les céramiques frittées à 1200°C subissent une profonde modification de leur état de surface et ne sont plus susceptibles de produire des microparticules après immersion dans le milieu de culture. La toxicité cellulaire observée pour les granules non préincubés est donc probablement due à l'état de surface de la matrice phosphocalcique, ne permettant pas l'adhésion cellulaire dans de bonnes conditions. Le traitement par frittage à 1200°C qui a eu pour effet de rendre la surface beaucoup plus lisse a permis de multiplier par 3 à 4 le pourcentage de cellules viables.

3.3- Conclusion

La céramique A4 possède une architecture poreuse interconnectée avec un réseau mésoporeux très développé mais elle n'est utilisable in vitro qu'au prix d'une préincubation en présence de milieu de culture.

Le mécanisme de toxicité cellulaire limitant l'utilisation de A4 est probablement lié à l'état de surface du biomatériau perturbant l'adhésion cellulaire.

Le traitement thermique à haute température par frittage à 1200°C permet à la céramique A4 de conserver une architecture poreuse interconnectée à dominante mésoporeuse et de « passiver » les capacités d'échanges ioniques de la matrice phosphocalcique avec le milieu environnant tout en modifiant profondément l'état de surface du matériau en le rendant plus favorable à l'adhésion cellulaire. Il en résulte une céramique qui offre des performances en terme de cytocompatibilité comparables à celles d'une céramique frittée à 1050°C et pré incubée en présence de milieu de culture.

Conclusion

Depuis les premières céramiques commerciales mises au point au cours des années 70 qui mimaient la composition chimique de l'os, les méthodes de fabrication n'ont cessé d'évoluer. L'optimisation de la composition chimique de ces substituts osseux a rapidement fait préférer les céramiques biphasées (résorbable) aux traditionnelles céramiques à base d'hydroxyapatite. La maîtrise du traitement thermique et du frittage en particulier a permis par la suite l'amélioration des propriétés mécaniques de ces biomatériaux dont les performances étaient à leurs débuts assez médiocres. L'intérêt de disposer de pores de diamètres suffisant (macropores) s'est vite imposé comme une évidence puisque permettant la pénétration des cellules ostéogéniques jusqu'à cœur du matériau. Ce concept a d'ailleurs été repris par la majorité des fabricants de céramiques phosphocalciques actuellement commercialisées. Mis à part l'implication des macropores sur les propriétés ostéoconductrices des céramiques et des micropores sur les propriétés mécaniques de l'implant, l'impact d'une architecture poreuse donnée sur les propriétés d'un matériau est aujourd'hui très mal connu et les formulations citées dans la littérature restent le fruit d'un certain empirisme. Le manque d'information de ces céramiques décrites comme possédant une porosité « totalement » interconnectée a été le moteur de cette étude.

L'objectif de ce travail a été de procéder à l'étude de l'architecture poreuse interconnectée des céramiques phosphocalciques biphasées et de mieux définir les conditions de fabrication et de formulation permettant d'apporter la maîtrise de ce paramètre.

La mise au point de méthodes d'études de la porosité et des paramètres d'interconnexion suffisamment discriminantes (perméamétrie à pression constante, diffusion d'un ion traceur, porosimétrie à mercure et modélisation tridimensionnelle des volumes poreux) a permis de mener à bien une étude comparative des principales céramiques phosphocalciques biphasées disponibles sur le marché français. Une forte hétérogénéité de leur architecture poreuse interconnectée a été mise en évidence. La perméabilité qui traduit l'aptitude d'un milieu poreux à se laisser traverser par un fluide, s'est en effet révélé très variable selon le type de céramique (les céramiques les plus perméables possèdent une perméabilité 2000 fois supérieure aux céramiques les moins perméables). Ce paramètre peut être considéré comme la

mesure de la facilité d'accès offerte par le réseau poreux interconnecté aux fluides biologiques mais aussi aux cellules ostéogéniques, aux vaisseaux et aux tissus. Le facteur de tortuosité est le second paramètre d'interconnexion qui a été mesuré et qui permet, tout comme la perméabilité, d'évaluer la facilité d'accès offerte aux fluides et aux tissus. La grande variabilité des valeurs de ces paramètres d'interconnexion laisse présager d'un comportement différent du biomatériau vis à vis des fluides (dissolution/précipitation) mais aussi des cellules et des tissus (propriétés d'ostéoconduction). Par ailleurs, l'absence de corrélation entre la perméabilité ou la tortuosité et la porosité totale de l'implant rappelle qu'une céramique peut être poreuse sans être interconnectée, soulignant l'intérêt d'une mesure systématique de la perméabilité et du facteur de tortuosité lors de toute étude de l'architecture poreuse des céramiques phosphocalciques biphasées.

Outre d'évidentes propriétés de biocompatibilité, le substitut osseux idéal doit à la fois présenter des propriétés mécaniques satisfaisantes et des capacités d'ostéoconduction permettant aux cellules ostéogéniques de pénétrer au cœur du biomatériau. Le mode d'élimination du porogène et par conséquent les mécanismes de création de la porosité des céramiques représente une des étapes clés pour la maîtrise de l'architecture poreuse interconnectée. Les formulations des céramiques testées dans ce travail font appel à une association de deux porogènes dont les modes d'élimination sont différents : le naphthalène qui est éliminé par sublimation et laisse des volumes poreux dont la taille varie fonction de la granulométrie de la poudre employée, et le saccharose dont l'élimination se fait par calcination après une étape d'ébullition. Il est apparu que l'augmentation de la proportion de porogène de 35 à 55% (v/v) a pour conséquence une augmentation de la porosité totale et de la perméabilité de la céramique. L'adjonction d'une proportion croissante de saccharose (à quantité de porogène constante) va de pair avec le développement d'un réseau mésoporeux et une forte augmentation de la perméabilité sans modification notable de la porosité totale de l'échantillon. Les céramiques formulées à partir d'une forte proportion de saccharose souffrent en revanche de faibles propriétés mécaniques. Ce constat démontre donc l'intérêt du saccharose en tant que porogène « interconnectant » et de l'association synergique entre ces deux porogènes qui après élimination permettent d'obtenir une céramique dotée d'une perméabilité plus de 1000 fois plus élevée que le même matériau formulé à partir de naphthalène seul.

La cytocompatibilité de la céramique présentant le meilleur compromis entre une architecture poreuse interconnectée et une résistance mécanique satisfaisante est cependant médiocre et la viabilité cellulaire au contact du biomatériau ne dépasse pas 16% par rapport au témoin. La préincubation de la céramique en présence de milieu de culture permet d'améliorer sensiblement ce paramètre mais interdit son utilisation extemporanée. Les possibilités d'association à des cellules osseuses pour réaliser un composé hybride s'en trouvent fortement limitées. L'hypothèse d'une toxicité par modification de la concentration ionique (ions calcium et phosphate) du milieu de culture a été écartée malgré les importantes modifications de concentration du milieu de culture au contact du biomatériau. De même, l'hypothèse d'une toxicité due à la phagocytose de microparticules de céramiques n'a pas été vérifiée. En revanche, la faible viabilité cellulaire est probablement due à un état de surface inadapté qui ne permet pas une bonne adhésion cellulaire au matériau. La modification de cet état de surface par frittage à haute température (1200°C au lieu de 1050°C) permet au matériau de présenter des performances en terme de cytocompatibilité in vitro similaires à celles des céramiques préincubées permettant une utilisation extemporanée à des fins d'ingénierie tissulaire.

Ce travail ouvre donc la porte à la réalisation de substituts osseux phosphocalciques à architecture contrôlée annonçant les thématiques de recherche futures telles l'adaptation de la porosité du biomatériau à l'indication chirurgicale ou réalisation de composés hybrides par culture de cellules autologues sur la matrice phosphocalcique à architecture optimisée.

Bibliographie

1. Akao. M, Aoki. H, Kato. K. Dense polycrystalline β -tricalcium phosphate for prosthetic applications. *J. Mater. Sci.* 1982 ; 17 : 343-346
2. Akao. M, Miura. N, aoki. H. Fracture toughness of sintered hydroxyapatite and bêta-tricalcium phosphate. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 1984 ; 92 : 672-674
3. Amit. K, Panchagnula. Skeletal drug delivery systems. *Int. Journal. of Pharmaceutics* 2000 ; 206 : 1-12
4. ANAES. Les substituts osseux. Publication de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Avril 1997 : 31 pages
5. Anderson. J.M, Miller. K.M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials.* 1984 ; 5(1) : 5-10
6. Aro.H.T, Aho.A.J, Clinical use of bone allografts. *Ann Med.* 1993 ; 25(4) : 403-412
7. Baslé. M F, Chappard. D, Grizon. F. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif. Tissue Int.* 1993 ; 53 : 348-356
8. Bear J. Dynamics of fluids in porous media. Dover Publications 1972 . 784 pages
9. Begley.C.T et al. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials.* 1995 ; 16(15) : 1181-1185
10. Benque E.P, Gineste. M, Heughbaert. M. Etude histologique de la biocompatibilité des cristaux d'Hydroxyapatite en chirurgie parodontale. *J. Biol. Buccale* ; 1985; 13 : 271-282
11. Beresford. J.N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1989 ; 240 : 270-280
12. Bernache-Assolant. D, Ababou. A, Champion. E et al. Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Calcination and particle growth. *Journal of the European Ceramic Society.* 2003 ; 23 : 229-241
13. Bernache-Assolant. D. Les frittage des phosphates de calcium. *Matériaux en phosphate de calcium, aspects fondamentaux.* Brès éditions. 1998 : 121-137
14. Bernache-Assolant. Les biocéramiques : élaboration et propriétés. *L'industrie céramique et verrière.* 1993 ; 880 : 431-434
15. Beruto.D , Botter. R, Fini. M. The effects of water in inorganic microsponges of calcium phosphates on the porosity and permeability of composites made with polymethylmethacrylate. *Biomaterials.* 2002 ; 23 : 2509-2517
16. Betz. R, Limitations of autograft and allograft : new synthetic solutions. *Orthopedics.* 2002 ; 25(5) : 561-570
17. Bignon. A, et al. Effect of micro-and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J. Mater. Sci. Mater Med.* 2003 ; 14(12) : 1089-1097
18. Block.M, Baughman.D. Reconstruction of severe anterior maxillary defects using distraction osteogenesis, bone grafts, and implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 ; 63 (3) : 291-297
19. Bohner. M, Baumgart. F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials.* 2004 ; 25 : 3569-3582

20. Bohner. M, et al. Kinetics of dissolution of beta-tricalcium phosphate. *J Colloid. Interface Sci.* 1997 ; 190(1) : 37-48
21. Bong-Soon. C, Choon-Ki. L, Kug-Sun. H et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials.* 2000 ; 21 : 1291-1298
22. Boone.D.W, Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin.* 2003 ; 8(1) : 1-14
23. Bouler J.M, Trecant. M, Delecrin. J et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J. Biomed Mater. Res.* 1996 ; 32 : 603-609
24. Boving T, Grathwohl. P. Tracer diffusion coefficients in sedimentary rocks : correlation to porosity to hydraulic conductivity. *J Cont Hydr.* 2001 ; 53 : 85-100
25. Boyce. R, Toriumi. DM. Consideration in the use of bone grafts and alloplastic implants in facial plastic and reconstructive surgery. *J. Long Term Effects of Med Implants.* 1992 ; 2 : 199-220
26. Boyce.T, Edwards. J, Scarborough. N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 1999 ; 30(4) : 571-581
27. Bucholz. R, Carlton. A, Holmes. R. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin. Orthop.* 1989 ; 240 : 53-62
28. Bucholz. R.W. Non allograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop. Relat. Res.* 2002 ; 395 : 44-52
29. Cao. Y, Mitchell. G, Messina. A et al., The influence of architecture on degradation and tissues ingrowth into three-dimensional poly (lactic- co-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2006 ; 27 : 2854-2864
30. Chaki. T, Wang. P. densification and strengthening of silver-reinforced hydroxyapatite matrix composite prepared by sintering; *J. Mater. Sci : Mater in Med.* 1994; 5 : 533-542
31. Chang. R, Chung. K, Kao. S. Histological and biomechanical studies of hydroxyapatite implant. *Proceedings of the Nat. Sci. Council, ROC, part B : Life Science* 1991 ; 15 : 212-219
32. Chappard. D, Fressonnet. C. Genty. C. Fat in bone xenografts : importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials.* 1993 ; 14 : 507-512
33. Chappard. D, Zhioua. A, Grizon. F. Biomateriaux de comblement osseux : comparaisons entre autogreffe d'hydroxyapatite et une xéno greffe bovine hautement purifiée. *Bull. Assoc. Des Anat.* 1993 ; 77 : 59-65
34. Chappard. D. Les cellules osseuses. *Collection Biologie de l'appareil locomoteur.* Editions Teot-Vidal Dossa Médical. Montpellier. 1990
35. Colin. I, Lamy. B, Gauthier. O, Bouler.J.-M., Improvement of macroporous biphasic phosphocalcic ceramics for the filling of bone defects. *ITBM – RBM.* 2005 ; 26 : 247 – 248
36. Constantz. B.R et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science.* 1995 ; 267 : 1796-1799
37. Cornell. C, Lane. J, Chapman. M, et al. Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. *J. Orthop. Trauma.* 1991 ; 5 : 1-8
38. Courpied. J.P et al. Pathologie osteo-articulaire de l'adulte en France. Enquête auprès d'un échantillon de 2000 personnes. 1999. <http://www.sofcot.com.fr/www/public/eval.htm>

39. Currey. JD. The mechanical properties of bone. *Clin.Orthop. Rel. Res.* 1970 ; 73 : 210-231
40. Daculsi. G et al. Comparative study of bioactive calcium phosphate ceramics after implantation in spongy bone in dogs. *Histologic, ultrastructural and electron probe microanalysis. Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appart. Mot.* 1989 ; 75(2) : 65-71
41. Daculsi. G, Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials.* 1998 ; 19(16) : 1473-1478
42. Daculsi. G, Corlieu. P, Bagot D'arc. M et al. Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration : experimental and clinical findings. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1992 ; 101 : 669-674
43. Daculsi. G, LeGeros. R.Z, Deudon. C, Scanning and transmission electron microscopy and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. Osseo-coalescence versus osseo-integration. *Scanning Microsc.* 1990 ; 4(2) : 309-314
44. Daculsi. G, Legeros. R.Z, Heughbaert et al. Formation of carbonate apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tiss. Int.* 1990 ; 46 : 20-27
45. Daculsi. G, Legeros. R.Z, Nery. E Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo : ultrastructural and physico-chemical caractérisation. *J. Biomed. Mater Res.* 1989 ; 23 : 883-894
46. Daculsi. G, Legeros. R.Z, Mitre. D. Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcif. Tiss. Int.* 1989 ; 45: 95-103
47. Daculsi. G, Passuti. N. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in human and dogs. *Clinical and histological study. J. Biomed. Mater. Res.* 1990 ; 24 : 379-396
48. Daculsi. G, Passuti. N. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin. Orthop.* 1989 ; 248 : 169-176
49. Daculsi. G, Passuti.N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1990 ; 11 : 86-87
50. Daculsi.G, et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003 ; 14(3) : 195-200
51. Damien. C, Parsons. J. Bone graft and bone graft substitutes : a review of current technology and applications. *J. Applied Biomaterials.* 1991 ; 2 : 187-208
52. De Bruijn J D. Calcium Phosphate Biomaterials. De Bruijn Ed; Haveka B. V ; Alblasterdam; 1993 : 9-26
53. Delloye. C, Verhelpen. M, D'Hemriccourt. J. Morphometric and physical investigations of segmental cortical bone autografts and allografts in canine ulnar defects. *Clin. Orth. Rel. Res.* 1992 ; 282 : 273-292
54. Delloye.C, How to improve the incorporation of massive allografts? *Chir Organ. Mov.* 2003 ; 88(4) : 335-343
55. Driessens. F.C.M. Physiology of hard tissues in comparison with the solubility of synthetic calcium phosphates. *Ann N.Y. acad. Sci.* 1988 ; 523 : 131-136
56. Ducheyne. P, Cuckler. J.M, Bioactive ceramic prosthetic coatings. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992 ; 276 : 102-114

57. El Deeb. M, Tompach. P, Morstad. A. Porous hydroxyapatite granules and blocks as alveolar ridge augmentation materials : a preliminary report. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1988 ; 46 : 955-970
58. Fernandez. E. et al. Modulation of porosity in apatitic cements by use of α tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures. *Biomaterials.* 2005 ; 26(17) : 3395-3404
59. Fischer. E.M., Layrolle. P., Van Blitterswijk. C.A. et al., Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng.* 2003 ; 9(6) : 1179-88
60. Flautre. B, Descamps. M, Delecourt. C et al. Porous HA ceramic for bone replacement : role of the pore and interconnections – experimental study in the rabbit. *J. Mater. Sci. Mat Med.* 2001 ; 12 : 679-682
61. Frederiks. D.C et al. Cellular interactions and bone healing responses to a novel porous tricalcium phosphate bone graft material. *Orthopedics.* 2004 ; 27(1) : 167-173
62. Friedenstein. A.J et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974 ; 17(4) : 331-340
63. Friedenstein. A.J. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976 ; 47 : 327-359
64. Friedlaender.G. et al. Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop clin North Am.* 1999 ; 30(4) : 583-588
65. Gastany. G, J. Margat. *Dictionnaire Français d'Hydrogéologie.* Masson. Paris 1977. 659 pages
66. Galois. L, Mainard. D, Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study. *Acta Orthop. Belg.* 2004 ; 70(6) : 598-603
67. Gamradt.G, Lieberman. J. Bone graft for revision hip arthroplasty : biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2003 ; 417 : 183-194
68. Gauthier. O et al. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial : a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials.* 2005 ; (26-27) : 5444-5453
69. Gauthier. O et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998 ; 19(1) : 133-139
70. Gauthier. O et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute : a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *J. Mater. Sci Mat. Med.* 2001 ; 12(5) : 385-390
71. Gauthier. O, et al. Non invasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003 ; 66(1) : 47-54
72. Gauthier. O, Bouler J.M., Aguado. E et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of percentage of macroporosity on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998 ; 19 : 133-139
73. Geraci. J.E. Vancomycin. *Mayo Clin. Proc.* 1977 ; 52 : 631-634
74. Grimm. M and Williams. J. Measurement of permeability in human calcaneal trabecular bone. *J. Biomechanics.* 1997 ; 30 (7) : 743-745
75. Haddock. S Debes. J, Nauman. Et al. Structure-function relationships for coralline hydroxyapatite bone substitute. *J. Biomed. Mat. Res.* 1999 ; 47 (1) : 71-78
76. Hassna. R, Ramay. R, Zhang. M, Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2004 ; 25 : 5171-5180

77. Hattori. T, Iwadate. Y, Kato. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from calcium pyrophosphate. *J. Mater. Sci. Let.* 1989 ; 8 : 305-306
78. Hattori. T, Iwadate. Y, Kato. T. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from calcium and acetate and triethylphosphate. *Adv. Ceram. Mater.* 1988 ; 3 : 426-428
79. Heymann. D, Pradal. G, Benahmed. M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol. Histopathol.* 1999 ; 14(3) : 871-877
80. Hing. K, Best. M, Bonfield. W. Characterization of porous hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. : Mat. Med.* 1999 ; 10 : 135-145
81. Hinz. P et al. A new resorbable bone void filler in trauma: early clinical experience and histologic evaluation. *Orthopedics.* 2002 ; 25 (5) : 597-600
82. Hong. L, Hengchang. X, De Groot. K. Tensile strength of the interface between hydroxyapatite and bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 1992 ; 26 : 7-18
83. Hui. P, Leung. P, Sher. A. Fluid conductance of cancellous bone graft as a predictor for graft-host interface healing. *J. Biomechanics.* 1996 ; 29 (1) : 123-132
84. Jansen. J et al., Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation. *Orthop Clin North Am.* 2005 ; 36(1) : 89-95
85. Janssen. F. W., Oostra. J, Van Oorschot. A, et al., A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials.* 2006 ; 27 : 315 – 323
86. Jarcho. M, Bolen. C.H, Thomas. M.B. hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *J. Mater. Sci.* 1976 ; 11 : 2027-2035
87. Jarcho. M, Kay. J.F, Gumaer. K.I et al. Tissue cellular and subcellular events at bone ceramic hydroxyapatite interface. *J. of Bioeng.* 1977 ; 1 : 79-92
88. Jarcho. M, Kay. J.F, Gumaer. K.I. Tissue cellular and subcellular events at bone ceramic hydroxyapatite interface. *J. of Bioeng.* 1977 ; 1 : 79-92
89. Karageorgiou. V, Kaplan. D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005 ; 26-27 : 5474-5491
90. Khairoun. I. et al. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002 ; 60(4) : 633-642
91. Khan.S, Tomin.E, Lane. J.M, Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am.* 2000 ; 31(3) : 389-398
92. Kijima. T, Tsutsumi. M. Preparation and thermal properties of dense polycrystalline hydroxyapatite. *J. Am. Ceram. Soc.* 1979 ; 62 : 455-460
93. Kruyt. M.C., Van Gaalen. S.M., Oner F.C., et al., Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds. *Biomaterials* 25 (2004) 1463 – 1473
94. Kurioka.K et al. Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconductive and stability. *Kobe J. Med. Sci.* 1999 ; 45(3-4) : 149-163
95. Kuznetsov. S.A, Mankani. H.M, Robey. P.G, Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation.* 2000 ; 70(12) : 1780-1787

96. Lecomte A. Evaluation de la porosité interconnectée de 2 céramiques phosphocalciques biphasées. Commercialisées sur le marché français. Thèse d'exercice. 2003 ; Université de Nantes: 117 pages
97. Lecomte. A, Gauthier. H, Bouler. JM. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. Apl. Biomat.* 2006 ; In proof.
98. Lecomte.A. Evaluation de la porosité interconnectée de 2 céramiques phosphocalciques biphasées. Mémoire de D.E.A. Faculté de Pharmacie de Nantes. 89 pages.
99. Legeros. R.Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin. Mat.* 1993 ; 14 : 65-88
100. LeGeros.R.Z, Properties of osteoconductive biomaterials:calcium phosphates. *Clin Orthop. Rel. Res.* 2002 ; 395 : 81-98
- 101.Liu D. Influence of porous microarchitecture on the in vitro dissolution and biological behaviour of porous calcium phosphates ceramics. *Materials Sciences Forum.* 1997 ; 250 : 183-208.
- 102.Biophysique. Editions Masson. 2001 : 263 pages
- 103.Rappels de cours. Collection PCEM. 1996 : 212 pages
- 104.Lu. J et al. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles- induced cellular damages. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004 ; 15(4) : 361-365
- 105.Lu. J, Flautre. B, Anselme. K et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in-vitro and in-vivo. *J. Mat. Sci. : Mat Med.* 1999 ; 10 : 111-120
- 106.Madawi. A, Powell. M, Crockard. H. Biocompatible osteoconductive polymer versus iliac graft : a prospective comparative study for the evaluation of fusion pattern after anterior cervical discectomy. *Spine.* 1996 ; 21 : 2123-2130
- 107.Mankani. H.M , Kuznetsov. S.A, Fowler. B. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol. Bioeng.* 2001 ; 72(1) : 96-107
- 108.Marie. P. Différenciation, fonctions et contrôle de l'ostéoblaste. 2001. *Médecine/Science* ; 17 (12) : 1252-1259
- 109.Martina. M., Subramanyam. G, Weaver. J.C. et al. Developing macroporous bicontinuous materials as scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005 ; 26 : 5609 – 5616
- 110.Mastrogiacomo. M, Scaglione. S, Matinetti. R et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* 2006 ; 27 : 3230-3237
- 111.Matthews. G, Moss. A, Ridgway. K. The effects of correlated networks on mercury intrusion simulations and permabilities of sandstone and other porous media. *Powder Technology* 1995 ; 83 : 61-77
- 112.Matthews. G, Ridgway. K. Modelling of simulated clay precipitation within reservoir sandstones. *Marine and Petroleum Geology* 1996 ; 13 (5) : 581-589
- 113.Meyer. M, Szulczewski D.H, Moëller. K et al. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cells and materials* ; 1993 ; 3 : 129-140
- 114.Miyamoto.Y et al. Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997 ; 37(4) : 457-464
- 115.Mollet. M. Hormone hypophysaire humaine de croissance. *Pharm. Hosp.* 1977 ; 46 : 47-52
- 116.Monographies du GESTO. Les substituts osseux en 2001. Edition de la SOFCOT : 32 pages.

- 117.Motoki. D, Mulliken. J. The healing of bone and cartilage. *Clin Plast Surg.* 1990 ; 17(3) : 527-544
- 118.Mueller. Y.M, Davenport. C, Ildstad. S.T. Xenotransplantation: application of disease resistance. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1999 ; 26(12) : 1009-1012
- 119.Nakamura. T, Yamamuro. T. Higashi. S et al. A new glass ceramic for bone replacement : evaluation of its bonding to bone tissue. *J. Biomed Mater. Res.* 1985 ; 19 : 685-698
- 120.Nauman. E, Fong K, Keaveny. Dependence of intra-trabecular permeability on flow direction and anatomic site. *Ann. of Biomed. Eng.* 1999 ; 27 : 517-524
- 121.Neo. M, Kotani. S, Nakamura. T et al. A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 1992 ; 26 : 1419-1432
- 122.NF C 26400 Détermination de la densité apparente d'un échantillon poreux.. Février 1998 : 8 pages.
- 123.NF EN 10993-5. Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro. AFNOR. 13 pages.
- 124.NF EN ISO 30993-1. Evaluation biologique des dispositifs médicaux - Lignes directrices pour le choix des essais. AFNOR. Juin 1994 : 12 pages.
- 125.Nicolazo. C, Gautier. H, Brandao. M-J. et al. Compactibility study of calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials.* 2003 ; (24) : 255-262
- 126.Norme NF ISO 4022. Matériaux métalliques frittés perméables – Détermination de la perméabilité aux fluides. AFNOR. Décembre 1998 : 12 pages.
- 127.Olivier. V, Fauchoux. N, and Hardouin. P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *DDT.* 2004 ; 9(18) : 233-239
- 128.Oonishi. H, Kushitani. S, Iwakih. et al. Long term clinical results of using Hap in revision of total hip replacement involving massive bone defects in acetabulum. *Bioceramics.* 1992 ; 8 : 157-162
- 129.Passuti. N, Delecrin J, Takahashi. S et al. Etude prospective randomisée comparant l'utilisation d'une céramique bioactive et d'une greffe autologue pour la réalisation d'une arthrodeèse dans le cadre de la correction des scolioses idiopathiques. *Rev. Chir. Orthop.* 1996 ; 87 (2) : 37
- 130.Pinault. A – Techniques d'analyse des oligoéléments chez l'homme. Paris: Technique et documentation; 2001, 238 pages
- 131.Pore Cor software version 1.32. Micromeretics, Atlanta, GA, USA
- 132.Pore Cor operator's manual version 1.32, Micromeretics, Atlanta, GA, USA
- 133.Pratt. J.N et al. Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroxyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects. *Biomaterials.* 2002 ; 23(16) : 3309-3317
- 134.Ratajczack. M.Z et al. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells-are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol.* 2004 ; 42(3) : 139-146
- 135.Raynaud. S, Champion. E, Bernache-Assolant. D et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ration I. Synthesis characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials.* 2002 ; 23 : 1065-1072
- 136.Redja B.V, Peelen. J, De groot. K. Tricalcium phosphate as a bone substitute. *J. of Bioeng.* 1977 ; 1 : 93-97
- 137.Rey. C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition structures and properties. *Biomaterials.* 1990 ; 11 : 13-15

138. Rougraff B. Bone graft alternatives in the treatment of benign bone tumors. *Instr Course Lect.* 2005 ; 54 : 505-512
139. Schmitt M. Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium. Thèse de doctorat. Université de Nantes. 2000 : 250 pages.
140. Seiler J.G., Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting : donor site complications. *J South Orthop Assoc.* 2000 ; 9(2) : 91-97
141. S.O.F.C.O.T. Etude d'évaluation de l'état ostéo-articulaire de la population française, de ses recours à la chirurgie orthopédique et de sa perception de la discipline. 1999. <http://www.sofcot.com.fr/www/public/eval/conferencechiffres.htm>
142. Suzuki O, Nakamura M, Miyasake Y. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *J. Exp. Med.* 1991 ; 164 : 37-50
143. Thalgott J.S et al. Anterior lumbar interbody fusion with titanium mesh cages, coralline hydroxyapatite, and demineralized bone matrix as part of a circumferential fusion. *Spine.* 2002 ; 2(1) : 63-69
144. Tomford W, Mankin H, Bone banking. Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am.* 1999 ; 30(4) : 565-570
145. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, et al., Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J. Biomat. Mater Res.* 1999 ; 44 : 98 – 108
146. Triaud F. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques de phosphates de calcium. Evaluation de 16 substituts osseux commercialisés. Mémoire de DIU. 2002 ; Université de Nantes : 32 pages.
147. Tsakirglou C, Payatakes A. A new simulator of mercury porosimetry for the characterization of porous materials. *J. Colloid Interface Science* 1990 ; 137 : 315-339
148. Uematsu K, Takagi M, Honda T. Transparent hydroxyapatite prepared by hot pressing of filter cake. *J. Am. Ceram. Soc.* 1989 ; 72(8) : 1476-1478
149. Urgelli B. A quoi correspond l'unité de mesure Darcy. Document internet (www.ens.lyon.fr/Planet-Terre/Forum/Geodynamique/Chimie-enveloppe/darcy.htm). Mars 2000. 6pages.
150. Urist M.R, Strates B.S. Bone Morphogenetic Protein. *J Dent Res.* 1971 ; 50(6) : 1392-1406
151. USBD, US Bone and Joint Decade. 2005. <http://www.usbjd.org/about/index.cfm>
152. Van Blitterswijk C.A, Grote J.J, Kuijpers W. Macropore tissue ingrowth : a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials.* 1986 ; 7 : 137-143
153. Verburg A, Klopper P, Van Den Hoof A. The healing of biologic and synthetic bone implants. *Arch. Orthop. Trauma.Surg.* 1988 ; 107 : 293-300
154. Vincent A, Delloye C; De Nayer P. Les allogreffes massives en chirurgie réparatrice. Cahiers d'enseignement de la SOFCOT. Conférences d'enseignement. 1990 : 1-20
155. Webb P, Orr C. Analytical methods in fine particles technology. Micromeritics Instrument corporation, Norcross GA USA. 1997 : 301 pages.
156. Weiner S, Traub W. Bone structure : from Angstroms to microns. *J. FASEB.* 1992 ; 6 : 879-885
157. Weiss P et al. A new injectable bone substitute concept (MBCP Gel TM): First clinical results in human maxillo-facial surgery. *Key Engineering Materials.* 2005 ; 285-286 : 1053-1056

158. Weather. P, Burkitt. H, Daniels. V. Les tissus squelettiques. Edition Medsi/Mac Graw Hill. Paris. 1990 : 142-160
159. Wills. R. McCoy. J. Interface-reaction-controlled kinetics in the hot isostatic pressing of submicrometer alumina powder. J. Am. Ceram. Soc. 1985 ; 68(4) : 95-96
160. Yaszemski. M.J et al. Evolution of bone transplantation : molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. Biomedicals. 1996 ; 17(2) : 175-185
161. Zerbo. I. et al., Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous β tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. Biomaterials. 2005 ; 26(12) : 1445-1451
162. Zijderfeld. S.A, et al. Maxillary sinus floor augmentation using a β -tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2005 ; 20(3) : 432-440

LISTE DES FIGURES, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : schéma du cycle de remodelage osseux selon Marie
- Figure 2 : Exemple de canaux d'interconnexion (BCP Bicalphos®) – Photo prise au Microscope électronique à balayage, grossissement x 20
- Figure 3 : Dispositif permettant la mesure de la perméabilité selon la norme AFNOR NF ISO 4022
- Figure 4 : perméamètre à pression consante selon Bear
- Figure 5 : principe de la mesure de la tortuosité
- Figure 6 : cuve de diffusion pour diffusion des iodures selon T. BOVING
- Figure 7 : Exemple de courbe d'intrusion de mercure (TRIOSITE®). *Volume cumulé d'intrusion = f (diamètre des pores)*
- Figure 8 : volume d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores pour JMB 4
- Figure 9 : volume d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores pour JMB 5
- Figure 10 : Exemple de représentation des volumes poreux interconnectés d'un échantillon de céramique
- Figure 11 : Fonctionnalités et flux d'informations de Pore Cor® d'après MATTHEWS
- Figure 12 : Courbe d'intrusion de mercure fonction du diamètre des pores
- Figure 13 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores > 1 micron
- Figure 14 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores de 0.1 à 1 microns
- Figure 15 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores > 1 micron
- Figure 16 : Modélisation du réseau poreux interconnecté : pores de 0.1 à 1 microns
- Figure 17 : Etude des proportions relatives des différentes classes de pores de JMB 4 en analyse d'image
- Figure 18 : Etude des proportions relatives des différentes classes de pores de JMB 5 en analyse d'image
- Figure 19 : Céramique JMB 4 - Image MEB
- Figure 20 : Céramique JMB 5 - Image MEB
- Figure 21 : Etude comparée des facteurs de tortuosité des 7 céramiques phosphocalciques biphasées testées
- Figure 22 : Diagramme des valeurs de porosité des 7 céramiques étudiées - Technique par porosimétrie à mercure
- Figure 23 : Courbe d'intrusion de mercure du CBC Ceraver®
- Figure 24 : Courbe d'intrusion de mercure du BCP Bicalphos®
- Figure 25 : Courbe d'intrusion de mercure du PHYSIO 6®
- Figure 26 : Courbe d'intrusion de mercure de l'EUROCER 200®
- Figure 27 : Courbe d'intrusion de mercure de la TRIOSITE®
- Figure 28 : Courbe d'intrusion de mercure du BCP Sofamor®
- Figure 29 : Courbe d'intrusion de mercure du BICERAM®
- Figure 30 : représentation Pore Cor® du BCP Sofamor®
- Figure 31 : représentation Pore Cor® du BCP Bicalphos®
- Figure 32 : représentation Pore Cor® du BICERAM®
- Figure 33 : représentation Pore Cor® du CBC Ceraver®
- Figure 34 : représentation Pore Cor® de l'EUROCER 200®
- Figure 35 : représentation Pore Cor® du PHYSIO6®
- Figure 36 : représentation Pore Cor® de la TRIOSITE®

Figure 37 : Représentation Pore Cor® du BCP Sofamor®
 Figure 38 : Photo du BCP Sofamor® prise au MEB (x20)
 Figure 39 : Représentation Pore Cor® de la TRIOSITE
 Figure 40 : Photo de la TRIOSITE prise au MEB (x20)
 Figure 41 : Représentation Pore Cor® du BICERAM-
 Figure 42 : Photo du BICERAM prise au MEB (x20)
 Figure 43 : Représentation Pore Cor® du PHYSIO 6
 Figure 44 : Photos du PHYSIO 6 prise au MEB (x20)
 Figure 45 : formule chimique développée du naphthalène
 Figure 46 : formule chimique développée du saccharose
 Figure 47 : Paramètres du traitement thermique des céramiques A1 à A8
 Figure 48 : profil d'intrusion de mercure de A1
 Figure 49 : profil d'intrusion de mercure de A4
 Figure 50 : profil d'intrusion de mercure de A6
 Figure 51 : profil d'intrusion de mercure de A8
 Figure 52 : représentation des volumes poreux interconnectés des céramiques A1 à A8 selon le logiciel Pore Cor
 Figure 53 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B1
 Figure 54 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B3
 Figure 55 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B4
 Figure 56 : profil d'intrusion de mercure de la céramique B7
 Figure 57 : représentation des volumes poreux interconnectés des céramiques B1 à B7 selon le logiciel Pore Cor
 Figure 58 : Puits de culture doté du dispositif Transwell®
 Figure 59 : Porogramme de A4 fritté à 1050°C
 Figure 60 : Porogramme de A4 fritté à 1200°C
 Figure 61 : Porogramme de MBCP fritté à 1050°C
 Figure 62 : Porogramme de MBCP fritté à 1200°C

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1: courbes débit d'air = f (différence de pression) pour JMB 4
 Graphique 2: courbes débit d'air = f (différence de pression) pour JMB 5
 Graphique 3 : perméabilités comparées de JMB4 et JMB5
 Graphique 4 : Cinétique d'apparition des ions iodures par diffusion dans le compartiment 2
 Graphique 5 : Perméabilités comparées des pores de plus de 1 µm.
 Graphique 6 : Perméabilités comparées des pores compris entre 0,1 et 1 µm
 Graphique 7 : Porosités totales des céramiques A1 à A8 déterminées par porosimétrie à mercure
 Graphique 8 : Porogrammes des céramiques A1 à A8 déterminées par porosimétrie à mercure
 Graphique 9 : Résultats de porosité totale des céramiques B1 à B7 déterminées par porosimétrie à mercure
 Graphique 10 : Porogrammes des céramiques B1 à B7 déterminées par porosimétrie à mercure
 Graphique 11 : Résultats de perméabilité de la fraction mésoporeuse des

céramiques B1 à B7

Graphique 12 : diamètres des canaux d'interconnexion de la fraction mésoporeuse des céramiques B1 à B7

Graphique 13 : Evolution comparée de la perméabilité et de la porosité fonction de la proportion de saccharose

Graphique 14 : Evolution des porogrammes des céramiques fonction de l'évolution de la proportion de saccharose

Graphique 15 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules non préincubés)

Graphique 16 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules incubés)

Graphique 17 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules préincubés)

Graphique 18 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules préincubés)

Graphique 19 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules préincubés)

Graphique 20 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules préincubés)

Graphique 21 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules préincubés)

Graphique 22 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules préincubés)

Graphique 23 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell

Graphique 24 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de MBCP incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell

Graphique 25 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

Graphique 26 : Cinétique d'évolution du pH du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

Graphique 27 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

Graphique 28 : Cinétique d'évolution du calcium du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules frittés à 1200°C)

Graphique 29 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de A4 (granules frittés à 1200°C)

Graphique 30 : Cinétique d'évolution du phosphate du milieu de culture en fonction de la masse de granules de MBCP (granules frittés à 1200°C)

Graphique 31 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules frittés à 1200°C et non incubés)

Graphique 32 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 et de MBCP par test MTS (granules frittés à 1200°C et incubés)

Graphique 33 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de A4 incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell (granules frittées à 1200°C)

Graphique 34 : Evaluation de la viabilité cellulaire des granules de MBCP incubés et non incubés par culture sur boîtes dotées du dispositif Transwell (granules frittées à 1200°C)

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : tableau récapitulatif des principales céramiques phosphocalciques biphasées présentes sur le marché français en 2003
- Tableau 2 : Perméabilités de différents matériaux biologiques ou de synthèse
- Tableau 3 : valeurs des coefficients de diffusion expérimentaux et des tortuosités de la céramique JMB 4
- Tableau 4 : valeurs des coefficients de diffusion expérimentaux et des tortuosités de la céramique JMB 5
- Tableau 5 : Tableau des dimensions, numéros de lots et compositions chimiques des BCP testés
- Tableau 6 : Tableau des caractéristiques de porosité des BCP testés
- Tableau 7 : Tableau des débits maximaux observés pour chaque céramique et nombre de Reynolds correspondant
- Tableau 8 : Tableau des perméabilités des sept céramiques phosphocalciques biphasées étudiées.
- Tableau 9 : Tableau des valeurs moyennes des coefficients de tortuosité des 7 BCP étudiés
- Tableau 10 : Tableau des valeurs des pourcentages de porosité déterminés par porosimétrie à mercure
- Tableau 11 : Tableau des pourcentages de porosité de 7 céramiques phosphocalciques biphasées - Technique par pycnométrie à hélium
- Tableau 12 : Tableau des proportions relatives en macropores, mésopores, micropores des 7 BCP étudiés – technique par porosimétrie à mercure
- Tableau 13 : Tableau des perméabilités fractionnées et diamètres des canaux d'interconnexion responsables de la perméabilité
- Tableau 14 : Résumé des caractéristiques de porosité et d'interconnexion des 7 céramiques étudiées
- Tableau 15 : Paramètres de formulation des céramiques A1 à A8
- Tableau 16 : Perméabilités moyennes des céramiques A1 à A8 déterminées par perméamétrie à pression constante
- Tableau 17 : Tortuosités moyennes des céramiques A1 à A8 déterminées par diffusion d'un ion traceur
- Tableau 18 : Valeurs des perméabilités fractionnées des céramiques A1 à A8
- Tableau 19 : Valeurs des diamètres des canaux d'interconnexion des céramiques A1 à A8
- Tableau 20 : Paramètres de formulation des céramiques B1 à B7
- Tableau 21 : résultats de perméabilité des céramiques B1 à B7 déterminées par perméamétrie à pression constante
- Tableau 22 : résultats de tortuosité des céramiques B1 à B7 déterminées par diffusion d'un ion traceur
- Tableau 23 : Résultats des perméabilités fractionnées des céramiques B1 à B7
- Tableau 24 : Résultats des diamètres des canaux d'interconnexion des céramiques B1 à B7
- Tableau 26 : caractéristiques de porosité des granules de céramique A4 et MBCP
- Tableau 27 : caractéristiques de porosité des granules de céramique A4 et MBCP frittées à 1050 et 1200°C

Annexes

Annexe 1

Modélisation du phénomène de diffusion en milieu poreux : 2^{ème} loi de Fick

2ème loi de FICK, modélisation du phénomène de diffusion en milieu poreux :

La diffusion d'un soluté sous l'effet d'un gradient de concentration au travers un milieu poreux est décrite par la seconde loi de FICK.

$$\varepsilon \cdot \frac{\delta C}{\delta t} = D_{\text{exp}} \cdot \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} - \rho \frac{\delta q}{\delta t} \quad (1)$$

avec ε la porosité, C la concentration en soluté, q la concentration de soluté adsorbé au sein du milieu poreux, ρ la densité du milieu poreux.

La solution analytique de cette équation donne la masse d'iode (M) ayant diffusé au travers du milieu poreux par unité de surface de l'échantillon :

$$M = C_0 \alpha d \left(\frac{D_{\text{exp}} t}{d^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp \left(\frac{-n^2 \cdot \pi^2 D_{\text{exp}} t}{d^2} \right) \right) \quad (2)$$

Conditions initiales et limites : $C(x, 0) = 0 \quad x > 0$

$C(0, t) = C_0 \quad t > 0$

$C(x, t) = 0 \quad x = \infty$

Avec C_0 est la concentration initiale en Iodures, $\alpha = \varepsilon + K_d \cdot \rho$ le facteur de capacité de la roche, d le diamètre de l'échantillon. $K_d \cdot \rho = 0$ si l'adsorption des Iodures aux parois des pores est négligeable ce qui est le cas pour la plupart des roches.

Sur une longue durée, l'équation (2) laisse apparaître une relation linéaire entre la masse d'Iodure ayant traversé la roche et le temps. Le phénomène de diffusion peut alors être exprimé de la manière suivante :

$$M = C_0 \cdot \alpha \cdot d \left(\frac{D_{\text{exp}} \cdot t}{d^2} - \frac{1}{6} \right) \quad (3 a)$$

ou

$$M = C_0 \cdot \left(D_{\text{exp}} \frac{t}{d^2} - \frac{\alpha \cdot d}{6} \right) \quad (3 b)$$

Pour exploiter les équations 3 a et 3 b et accéder au coefficient de diffusion expérimental (D_{exp}), la masse d'Iodure doit être transformée en concentration d'Iodures. Une conversion d'unité doit donc être réalisée de manière à placer les données expérimentales selon un axe des abscisses t / h^2 (temps / épaisseur de l'échantillon ²) et un axe des ordonnées $C_t V_t / C_0 A h$ (concentration iodures . volume de la cuve / Concentration à $t=0$. Aire de l'échantillon . épaisseur de l'échantillon) (40) . La pente de la droite obtenue correspond au coefficient de diffusion expérimental des iodures (D_{exp})

Si cette représentation graphique est indispensable au calcul de D_{exp} sa complexité lui fait préférer une présentation des données expérimentales sous un format plus classique :

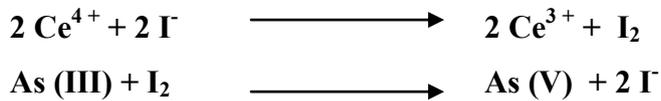
$$[I] = f(t)$$

Annexe 2

Dosage des iodures par méthode colorimétrique

Technique :

La technique est basée sur la capacité des iodures à catalyser l'oxydation de l'arsenic III par le cérium IV. La réaction a lieu en 2 étapes :



En présence d'iodure, le cérium (IV) oxyde l'arsenic (III) et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en iodures et à la concentration en cérium de la solution. La réaction est arrêtée au bout de 20 minutes par ajout d'un réducteur (Brucine) qui est transformé par le cérium en un composé coloré dont on mesure l'absorbance.

Le logarithme de l'absorbance est directement proportionnel à la concentration en iodures.

Protocole expérimental :

- 1 – Mélange de 100 μl de la solution à doser préalablement diluée + 900 μl de solution de KNO_3 à 0,1 M + 1ml de solution d' As_2O_3 à 0,56% (m/m)
- 2 - Incubation pendant 5 minutes à 30°C
- 3 - Ajout d' 1 ml de solution de sulfate de cérium à 0,4 % (m / m)
- 4 - Incubation pendant 20 minutes précises à 30°C
- 5 - Ajout de 0,5 ml de solution de Brucine à 0,5 % (m / m)
- 6 - Lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 446 nm.

Réactifs utilisés :

- *Solution d'As₂O₃ à 0,56% (m/m) :*

5,6g d'As₂O₃

2,8 g de KOH

3g de NaCl

75 ml d'H₂SO₄ à 97 %

Eau QSP 1000 ml

- *Solution de cérium (IV) à 0,4 % (m / m) :*

4 g de sulfate de cérium

50 ml d'H₂SO₄ à 97 %.

Eau QSP 1000 ml

- *Solution de Brucine à 0,5 % (m / m)*

5g de Brucine déshydratée

1000 ml d'Acide acétique 0,3 %

Annexe 3

Inclusion dans le Glyco Méthyl MéthAcrylate (GMMA)

Préparation des échantillons :

- Méthyl Méthacrylate (MMA) purifié (conservé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) :

Mettre 500 ml de MMA dans une ampoule à décanter puis ajouter 250 ml de NaOH 5 %.

Mélanger et attendre la séparation des phases. Eliminer la soude de l'ampoule à décanter.

Renouveler l'opération à 3 reprises. Filtrer sur cristaux de CaCl_2 et placer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant une nuit. Eliminer le lendemain les cristaux de glace formés par filtration sur Büchner. On obtient du MMA purifié sans hydroquinone ni eau.

- Milieu catalyseur :

Mettre 1 g de peroxyde de benzoyle dans 90 ml de MMA purifié et mélanger sous agitation magnétique. Placer le mélange à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant quelques heures pour éliminer les cristaux de glace ainsi formés. Ajouter 10 ml de Polyéthylène glycol 400 puis filtrer au Büchner pour éliminer la glace.

- Milieu initiateur :

Mettre 1 ml de NN diméthylaniline dans 19 ml de propanol-2 puis mélanger

- Milieu d'imprégnation :

Mettre 60 μl de milieu catalyseur dans 5 ml de MMA purifié

Technique :

1 – Déshydratation du biomatériau par immersion dans l'acétone pure pendant 4 jours en changeant le bain d'acétone au bout de 2 jours

2 – Séchage

3 – Imprégnation par immersion de l'échantillon dans le MMA purifié pendant 4 jours avec renouvellement du bain de MMA au bout de 2 jours.

4 – Inclusion par immersion dans le milieu d'imprégnation préparé extemporanément

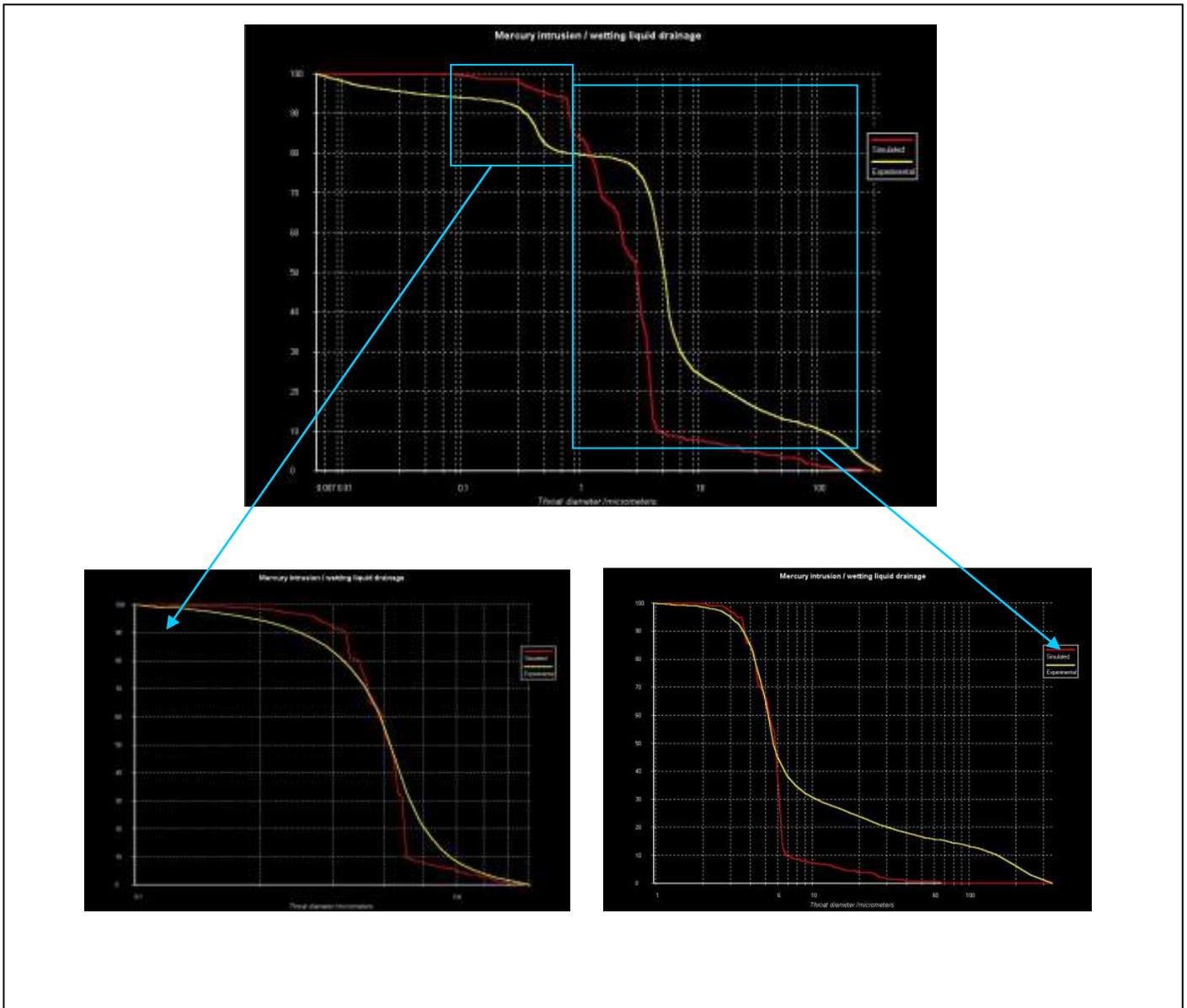
5 – placer 3 jours à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour obtenir une bonne polymérisation du MMA en GMMA

Annexe 4
Rapport d'analyse de porosimétrie à mercure :
Exemple du BCP Bicalphos

Annexe 5

Fractionnement de la courbe d'intrusion de mercure

Fractionnement de la courbe d'intrusion de mercure :



La courbe d'intrusion de mercure possède un aspect bi modal et doit être scindée en deux parties pour obtenir un tracé d'aspect sigmoïdal.

Le découpage réalisé permet de distinguer une courbe d'intrusion de mercure pour les pores de diamètres supérieurs à 1 μm et une autre courbe pour les pores de diamètres compris entre 0,1 et 1 μm .

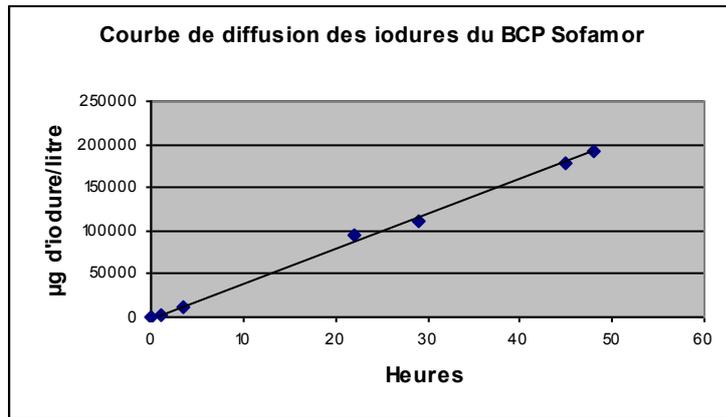
Annexe 6

Courbes de diffusion des ions iodures

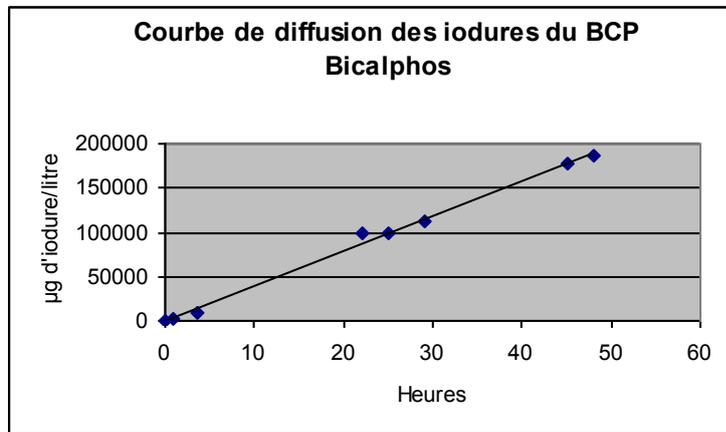
Paramètres de diffusion et calcul de la tortuosité

Courbes de diffusion des iodures

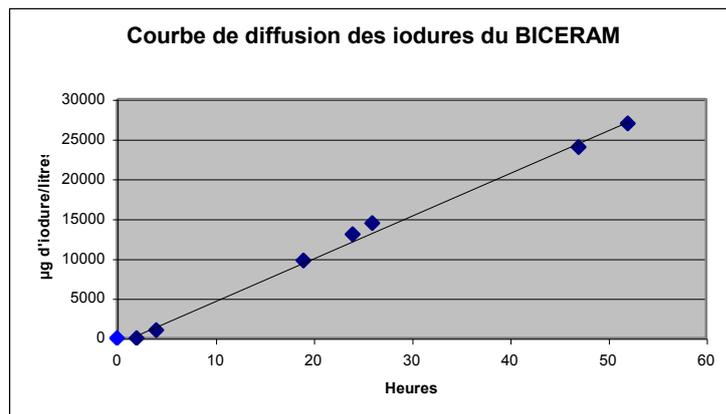
BCP Sofamor :



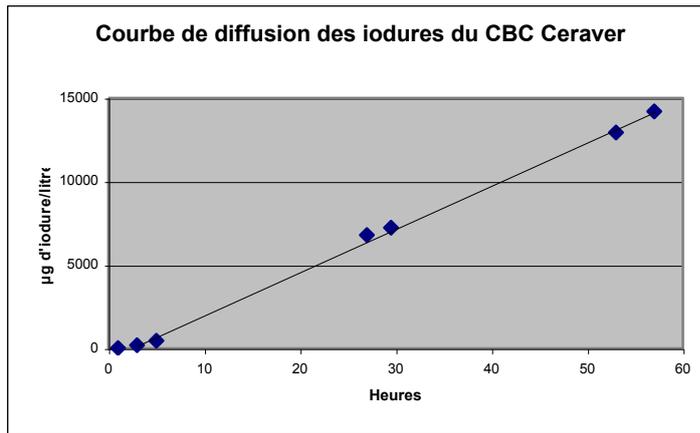
BCP Bicalphos :



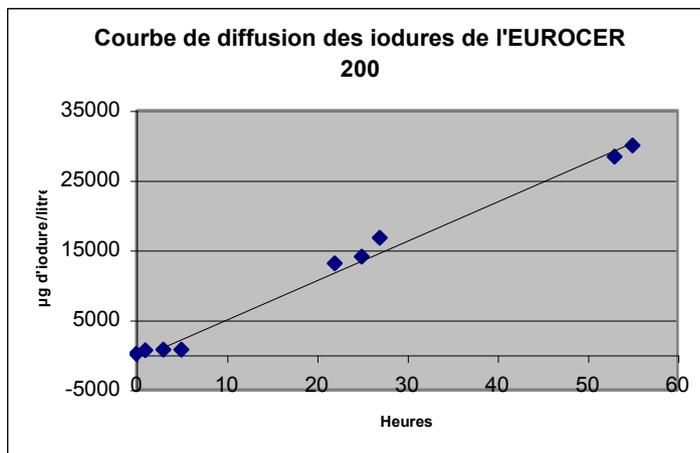
BICERAM



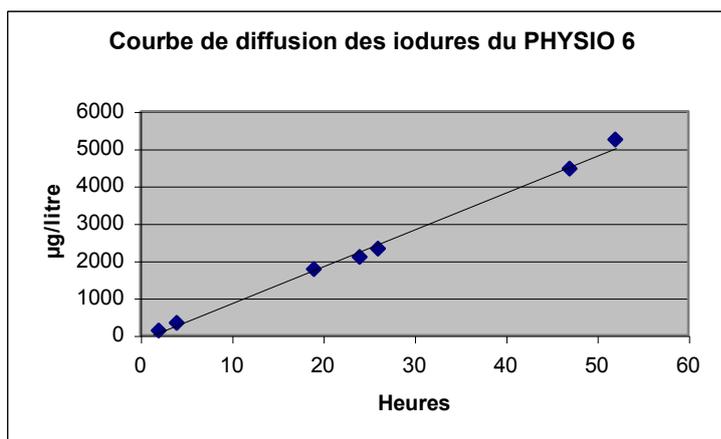
CBC Ceraver



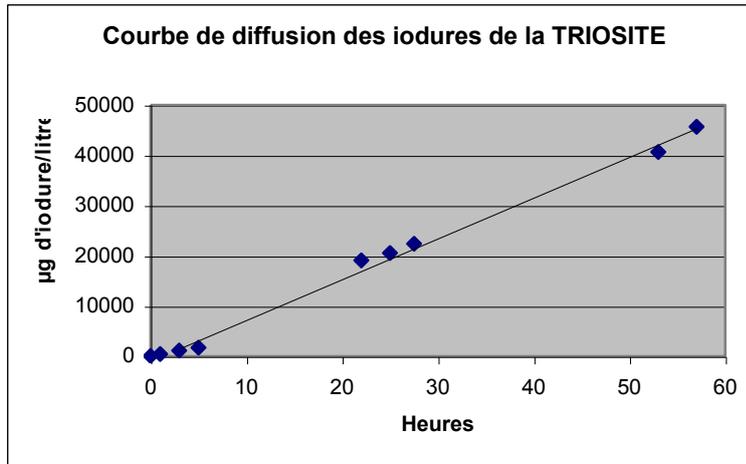
EUROCER 200 :



PHYSIO 6 :



TRIOSITE :



Paramètres de diffusion des céramiques analysées :

Céramique	Equation droite des moindres carrés $y[\mu\text{g/l}]=a[\text{heure}].x+b$	Coefficient de diffusion expérimental [m ² .s]	Facteur de tortuosité	Ecart type réduit
BCP Sofamor®	$Y=4020.x -1214$	$3.19.10^{-8}$	2.8	1.0
BCP Bicalphos®	$Y=4002.x+34$	$3.21.10^{-8}$	3.5	1.1
BICERAM®	$Y=528.x-262$	$4.14.10^{-9}$	15.3	1.6
CBC Ceraver®	$Y=254.x-357$	$1.92.10^{-9}$	44.6	5.1
EUROCER 200®	$Y=557.x-217$	$4.39.10^{-9}$	20.0	2.9
PHYSIO 6®	$Y=99.x-104$	$7.58.10^{-10}$	96.0	11.0
TRIOSITE®	$805.x-460$	$6.31.10^{-9}$	19.1	3.2

Annexe 7

***Paramètres de porosité et d'interconnexion fournis par
porosimétrie à mercure et
par le logiciel Pore Cor®***

Paramètres de porosité fournis par porosimétrie à mercure :

BCP Sofamor	Surface du réseau poreux (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	1.431	48.17	76.5	7	16.5
Echantillon 2	5.919	35.4	43.2	18.4	38.4
Echantillon 3	6.987	57	60.7	5.4	33.9
Echantillon 4	2.819	45	63.7	9	27.3
Echantillon 5	9.822	57.2	42	2	56
Moyenne	5.4	48.6	57.2	8.4	34.4
Ecart type réduit	3.0	8.1	13.1	5.5	13.1

BCP Bicalphos	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	6.832	55.7	77.9	1.9	20.2
Echantillon 2	9.153	86	57.9	16.4	25.7
Echantillon 3	4.174	78.2	72.8	2.7	24.5
Echantillon 4	5.247	52.1	70.9	3.8	25.3
Moyenne	6.4	68.0	69.9	6.2	23.5
Ecart type réduit	1.9	14.4	7.4	5.9	2.4

BICERAM	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	3.154	36.8	14.5	25.2	60.3
Echantillon 2	3.192	41.7	15.3	15.8	68.9
Echantillon 3	2.528	25.9	15	29.2	66.9
Echantillon 4	4.514	38.9	21.2	32	46.8
Echantillon 5	3.336	27	15.6	26.6	57.8
Moyenne	3.3	34.1	16.3	25.8	60.1
Ecart type réduit	0.6	6.4	2.5	5.5	7.8

CBC Ceraver	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	3.829	41.2	3.9	1.1	95
Echantillon 2	4.24	51.4	3.9	1.3	94.8
Echantillon 3	3.223	51.3	3.2	4.5	92.3
Echantillon 4	5.094	40.1	3.7	4.4	91.9
Moyenne	4.1	46.0	3.7	2.8	93.5
Ecart type réduit	0.7	5.4	0.3	1.6	1.4

EUROCER 200	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	3.026	46.5	70.1	6.8	23.1
Echantillon 2	2.174	40.2	64.6	4.3	31.1
Echantillon 3	3.111	49.2	65.7	5	29.3
Echantillon 4	3.132	53.3	39	2.6	58.4
Moyenne	2.9	47.3	59.9	4.7	35.5
Ecart type réduit	0.4	4.8	12.2	1.5	13.6

PHYSIO 6	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	5.895	45.5	5.3	27.2	67.5
Echantillon 2	2.19	35.6	8.6	23.1	68.3
Echantillon 3	3.454	36.5	21.2	18.9	59.9
Echantillon 4	3.817	38.8	8.5	28.4	63.1
Moyenne	3.8	39.1	10.9	24.4	64.7
Ecart type réduit	1.3	3.9	6.1	3.7	3.4

TRIOSITE	Surface (m²/g)	Porosité (%)	% Macropores	% Mésopores	% micropores
Echantillon 1	8.35	74.9	13.7	27.5	58.8
Echantillon 2	10.714	56.05	12.4	29.9	57.7
Echantillon 3	7.875	72.5	13.8	18.1	68.1
Echantillon 4	5.818	54	13.8	33	53.2
Moyenne	8.2	64.4	13.4	27.1	59.5
Ecart type réduit	1.7	9.4	0.6	5.6	5.4

Paramètres d'interconnexion fournis par le logiciel Pore Cor® :

Perméabilités fractionnées :

BCP SOFAMOR		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	2.7E+05	1.3E+05
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	1.1E+02	4.9E+01
due aux micropores (< 10 µm)	4.2E-02	9.8E-03

BCP Bicalphos		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	7.6E+05	2.2E+05
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux micropores (< 10 µm)	3.0E-02	1.0E-02

BICERAM		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	2.3E+05	3.0E+05
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	8.2E+02	2.1E+02
due aux micropores (< 10 µm)	5.6E-02	7.6E-02

CERAVER		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux micropores (< 10 µm)	2.9E-03	8.5E-04

EUROCER 200		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	3.9E+06	1.9E+06
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux micropores (< 10 µm)	2.6E-02	2.7E-03

PHYSIO 6		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	2.8E+01	8.4E+00
due aux micropores (< 10 µm)	3.4E-01	5.6E-02

TRIOSITE		
Perméabilité (MilliDarcies)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 µm)	0.0E+00	0.0E+00
due aux mésopores (10<diamètre<100 µm)	6.0E+01	1.9E+01
due aux micropores (< 10 µm)	1.0E+00	3.3E-01

Diamètre équivalents des canaux d'interconnexion (D_{50}):

BCP Sofamor		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	176	3
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	11.9	1.8
due aux micropores (< 10 μm)	0.22	0.03

BCP Bicalphos		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	155	8
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	0	0
due aux micropores (< 10 μm)	0.50	0.03

BICERAM		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	185	26
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	16.1	1.5
due aux micropores (< 10 μm)	0.30	0.06

CERAVER		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	0	0
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	0	0
due aux micropores (< 10 μm)	0.76	0.02

EUROCER 200		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	161	9
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	0	0
due aux micropores (< 10 μm)	0.22	0.02

PHYSIO 6		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	0	0
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	18.5	1.2
due aux micropores (< 10 μm)	0.31	0.01

TRIOSITE		
D_{50} (μm)	Moyenne	Ecart type réduit
due au macropores (diamètre > 100 μm)	0	0
due aux mésopores (10<diamètre<100 μm)	18.5	1.2
due aux micropores (< 10 μm)	0.37	0.01

Annexe 8 : protocole de dosage MTS

DOSAGE MTS

I-Resumé :

On veut quantifier la viabilité cellulaire. Pour cela, on utilise un test colorimétrique qui se base sur la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de tetrazolium MTS en formazan.

II- Matériel utilisé:

Lecteur de plaques-spectromètre

Timeur

III- produits utilisés:

MTS

PMS

Milieu de culture

IV- Préparation des solutions utilisées :

A-MTS à 2mg/ml :

Le produit commercial est en poudre. On a une quantité de 250mg que l'on reprend dans 125mL de milieu DMEM sans FCS pour obtenir une solution à 2mg/ml. On homogénéise bien et on répartit 2,5mL de cette solution dans des tubes de 15mL.

La solution est conservée à -20°C .

B-PMS à 0,96g/ml :

Le produit commercial est en poudre. On a une quantité de 1g que l'on reprend dans 1046mL de milieu DMEM sans FCS pour obtenir une solution à 0,96g/ml. On homogénéise bien et on répartit 100 μ L de cette solution dans des microtubes de 1,5mL.

La solution est conservée à -20°C .

C-PMS à 960 mg/ml :

On utilise les aliquots préparés à 0,96mg/ml et stockés à -20°C et on le dilue 1000 fois dans de l'eau distillée soit 1mL dans 999mL. La solution obtenue n'est pas conservée après utilisation.

V- Protocole :

A-Préparation du matériel dans l'ordre :

1-Lecteur de plaques-spectromètre

Il faut allumer le PC et le spectromètre au début de l'expérience. Le nom d'utilisateur est jéjé et le mot de passe est ATDC5.

B-Préparation du réactif :

Solution stock	Volume
MTS à 2mg/ml	2,5 mL
PMS à 960 μ g/ml	125 μ L

On distribuera 100 μ l du réactif ainsi préparé par puits.

C-Préparation des cellules :

On retire le milieu de culture et on ajoute 500 μ l de milieu frais. On ajoute 500ml dans 2 puits sans cellules ni pastilles de biomatériaux qui serviront de contrôles pour la réaction colorimétrique.

D-Réaction colorimétrique :

On ajoute 100ml/puits de réactif préparé au paragraphe V-B en commençant par les puits contrôles (plastique+milieu seul).

On homogénéise en remuant la plaque par mouvements de rotation.

On incube de 5 mins à 4h à 37°C-%CO₂.

Il faut surveiller régulièrement l'évolution de la coloration par rapport au témoin. Quand la coloration devient plus foncée dans les puits avec cellules seules par rapport aux puits contrôles (milieu seul), on stoppe la réaction.

E-Dosage de l'activité déshydrogénase des mitochondries :

Quand la réaction est stoppée, on prélève 200 μ l de chaque puits que l'on transfère dans une plaque 96 puits.

On lit au spectromètre à 490nm.

Sur le bureau de l'ordinateur, on choisit ouvre le logiciel Biolinx. On va dans File puis Open assay et on sélectionne l'essai Mtscv.assay (les 96 puits seront lus).

Dans l'essai Mtscv, on appuie sur Connect. Le support de plaque sort du spectromètre.

On y place la plaque en vérifiant qu'elle est bien positionner.

On appuie sur Read puis sur OK dans la fenêtre qui s'affiche ensuite.

La plaque est lue et les valeurs s'affichent. On les imprime et on les sauvegarde. Si les valeurs sont supérieures à 1, on dilue au demi dans de l'eau et on lit à nouveau la plaque.

Development, Control and Optimization of interconnected porous architecture for biphasic calcium phosphate ceramics

Porous micro architecture is one of the main quality parameter for biphasic calcium phosphate implants. It allows a deep penetration of fluids and osteogenic cells into the ceramic. Consequently, interconnection of macro, meso and micropores is required to allow osteoconduction.

Interconnected porosity has been quantified using original analysis methods such as permeability and tortuosity factor measurement and the use of a 3D void space modelling software to characterize the ceramics.

Using these methods, ceramics have been synthesized to identify formulation parameters that govern interconnected porosity. The importance of % of porogen, the association of two porogens and the “interconnecting” role of sucrose have been put into relief.

In vitro cellular cytocompatibility assays have been performed to evaluate and optimise biological properties of our ceramics.

Antoine LECOMTE

Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2006)

RESUME

Les propriétés biologiques et physico-chimiques des céramiques phosphocalciques biphasées ne peuvent s'exprimer que si leur architecture est adaptée à une diffusion en profondeur des fluides biologiques ainsi qu'à une colonisation du matériau par les cellules ostéogéniques. Cette architecture particulière des BCP est constituée par une structure de type macro, méso et microporeuse qui doit nécessairement être interconnectée.

Faisant appel à des techniques d'analyse originales telles que la mesure de la perméabilité, du facteur de tortuosité ou l'utilisation d'un logiciel de modélisation des volumes poreux, cette étude propose une méthodologie d'évaluation et de quantification de l'architecture poreuse interconnectée.

Ces méthodes ont été mises à profit pour identifier les paramètres de synthèse permettant l'obtention d'une architecture poreuse optimisée. L'importance du pourcentage de porogène, l'utilisation de deux porogènes en association et le rôle « interconnectant » du saccharose ont ainsi été mis en évidence.

Une étude cellulaire in vitro a permis d'évaluer et d'améliorer les propriétés biologiques de ces céramiques à architecture fortement interconnectée.

DISCIPLINE

Sciences pharmaceutiques/ Pharmacie Galénique

MOTS CLES :

Céramique phosphocalcique biphasée, architecture poreuse, interconnexion, perméabilité, facteur de tortuosité, porogène, saccharose