

UNIVERSITÉ DE NANTES
U.F.R. D'ODONTOLOGIE
École doctorale de Biologie – Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANTES

Discipline : Ingénierie osseuse
Spécialité : Biomatériaux

Serge BAROTH

**Développement de céramiques phosphocalciques injectables
pour la reconstruction osseuse**

Présentée et soutenue publiquement le 20 Mars 2009
devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Mme Racquel LEGEROS Professeur des Universités, Université de New-York (New-York, Etats-Unis)
M. Eric AGUADO Maître de Conférence, Université de Nantes (Nantes, France)

Examineurs :

M. Philippe ROSSET Professeur des Universités, Université de Tours (Tours, France)
M. Eric GOYENVALLE Maître de Conférence, Université de Nantes (Nantes, France)

Directeur de thèse :

M. Guy DACULSI Directeur de Recherche, INSERM (Nantes, France)

Co-encadrant de thèse :

M. Xavier BOURGES Ingénieur R&D, Société COVIDIEN (Trévoux, France)

Membre invité :

M. Pascal BORGET Ingénieur R&D, Société BIOMATLANTE (Vigneux de Bretagne, France)

LISTE DES PUBLICATIONS

Brevets :

Brevet 1 : « Hydrogel et ses applications biomédicales » (PCT/EP2007/062470) ; Biomatlante déposant ; Inventeurs : **S. Baroth**, G. X. Bourges.

Brevet 2 : « Substitut osseux comprenant un agent de contraste, son procédé de préparation et ses utilisation » (PCT/EP2008/064229) ; Biomatlante déposant ; Inventeurs : **S. Baroth**, G. Daculsi, X. Bourges.

Journaux internationaux indexés SCI :

S. Baroth, X. Bourges, E. Goyenvalle, E. Aguado, G. Daculsi. Injectable biphasic calcium phosphate bioceramic: the Hydros® concept. *Bio-Medical Materials and Engineering* (accepté, sous presse).

S. Baroth, G. Daculsi, E. Goyenvalle, E. Aguado, B.H. Fellah, Yan Cherel, P. Layrolle. Bone growth in a moldable filler containing submicron particles and macro- microporous granules of biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* (soumis).

Journaux internationaux non indexés SCI :

S. Baroth, X. Bourges, B.H. Fellah, G. Daculsi. Radiopaque Strategy for Bone Injectable Substitute. *Key Engineering Materials* 2008, 361-363 :39-42

X. Bourges, **S. Baroth**, E. Goyenvalle, R. Cagnet, F. Moreau, P. Pilet, E. Aguado, G. Daculsi. Vertebroplasty in Goat Model using Macroporous Calcium Phosphate Cement (MCPC®). *Key Engineering Materials* 2008, 361-363 :377-380

G. Daculsi, E. Aguado, P. Corre, X. Bourges, **S. Baroth**, E.Goyenvalle. Improvement of Radio Opacity of Injectable Bone Substitute MBCP Gel™ for Minimal Invasive Surgery MIS. *Key Engineering Materials* 2008, 361-363 : 1277-1280

X. Bourges, E. Aguado, E. Goyenvalle, **S. Baroth**, G. Daculsi. Macroporous Calcium Phosphate Cement (MCPC®) for bone reconstruction in cranioplasty: Animal study performance. *Key Engineering Materials* 2009, 396-398 :245-248

G. Daculsi, P.A. Uzel, N. Bourgeois, T. Le François, J.L. Rouvillain, X. Bourges, **S. Baroth**. New injectable bone substitute using reversible thermosensitive hydrogel and BCP granules: *in vivo* rabbit experiments. *Key Engineering Materials* 2009, 396-398 :457-460

P. Layrolle, **S. Baroth**, E. Goyenvalle, E. Aguado, F. Moreau, G. Daculsi. In vivo performance of an injectable biphasic calcium phosphate bone filler. *Key Engineering Materials* 2009, 396-398 : 583-586

GLOSSAIRE

BCP Biphasic Calcium Phosphate / Phosphate de calcium biphasé

BMP Bone Morphogenetic Protein / Protéine osseuse morphogénétique

CDA Calcium Deficient Apatite / Apatite déficiente en calcium

CPC Calcium Phosphate Cement / Ciment phosphocalcique

DDS Drug Delivery System / Système de libération de principes actifs

DRX Diffraction des Rayons X

EDX Energy Dispersive X

HA Hydroxyapatite

IBS Injectable Bone Substitute / Substitut osseux injectable

IL Interleukine

IRTF InfraRouge à Transformée de Fourier

ISO International Standard Organization

MEB Microscopie Electronique à Balayage

MEC Matrice Extra-Cellulaire

MET Microscopie Electronique à Transmission

MIS Minimal Invasive Surgery / Chirurgie à minima

MMA Méthyl Méthacrylate

MTS Mitosis Tetrazolium Salt

PAL Phosphatase Alcaline

RO RadiOpaque

TNF Tumor Necrosis Factor

TRAP Tartrate-Resistant Acid Phosphatase / Phosphatase acide tartrate resistente

β-TCP Tri Calcium Phosphate β

RESUME

Les substituts osseux synthétiques constituent une alternative à l'utilisation des greffes osseuses. Parmi ces matériaux, les céramiques phosphocalciques sont des candidats de choix puisque biocompatibles, ostéogéniques et disponibles sous plusieurs formes leur permettant de s'adapter à l'indication (blocs, granules, revêtement). Avec le développement de la chirurgie osseuse à minima, le besoin en substituts osseux injectables est devenu nécessaire. Le « granule concept » développé par Daculsi est à la base de matériaux composites injectables associant des granules de céramique pour l'ostéogénicité et des matériaux apportant propriétés mécaniques ou d'injection (ciments, polymères). Dans ce cadre nous avons développé et testé plusieurs matériaux injectables. Nous avons d'abord cherché à améliorer l'injection de ces matériaux en optimisant la forme des granules de céramique par différents procédés. Ces granules servant d'échafaudage à la repousse osseuse ont servi de base à l'élaboration de nos matériaux injectables qui par leur composition possèdent des procédés de repousse différents. Notre premier matériau, une pâte de céramique phosphocalcique, composée de plusieurs fractions de granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) favorise la repousse osseuse en induisant une réaction inflammatoire locale. Ensuite, 2 types de suspensions injectables ont été mises au point et dont la composition de la phase continue constituée de polymères innovants est changée. Enfin, pour les besoins en matériaux radiopaques pour les indications en chirurgie du rachis, nous avons optimisé le contraste apporté par les granules de BCP en leur associant des composés radiopaques. Ce travail a donné lieu à la commercialisation d'un substitut osseux (Hydros®) et au dépôt de 2 brevets concernant la mise au point de BCP radiopaque et d'un polymère innovant.

ABSTRACT

Synthetic bone grafts represent alternatives to autologous bone grafts. Calcium phosphate bioceramics are perfect candidates as they are biocompatible and provide osteogenic properties and are available under numerous shapes to fit perfectly various surgical applications (bulk, granules or coatings). Moreover, minimal invasive surgery (MIS) led the development of injectable bone substitutes. The “granule concept”, developed by Daculsi, allows the expansion of new injectable composite materials composed of CaP granules for bioactivity and other materials, as polymers or CaP cements, to improve injectable and/or mechanical properties. In this context we have tested new injectable materials. First of all, injectability has been improved by using various galenic methods to optimized granule shape. These granules have been used for the conception of our osteogenic injectable materials. Our first material, a putty, is composed of several fractions of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) nano- micro-particles and granules, improve bone ingrowth by inducing local inflammatory response. Then, two calcium phosphate granule suspensions have been developed that are composed of two new polymeric phases. Finally, for minimal invasive surgery (MIS), BCP material radiopacity has been improved. From this work, one substitute has been commercialized and two patent have been deposited.

SOMMAIRE

I. PREAMBULE.....	1
II. CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. ORGANISATION ET COMPOSITION DU TISSU OSSEUX.....	4
II.1.1. La matrice extracellulaire (MEC).....	5
II.1.2. Les cellules osseuses.....	5
II.1.3. Remodelage osseux.....	6
II.1.4. Réparation spontanée du tissu osseux.....	8
II.1.5. Des greffes osseuses aux matériaux synthétiques de substitution.....	8
II.2. GENERALITES SUR LES BIOMATERIAUX	9
II.2.1. Introduction.....	9
II.2.2. Définition.....	9
II.2.2.1. Biocompatibilité.....	10
II.2.2.2. Bio-fonctionnalité.....	11
II.2.3. Les Biomatériaux de référence	12
II.2.3.1. Les matériaux d'origine naturelle.....	12
II.2.3.2. Les métaux	13
II.2.3.3. Les polymères.....	13
II.2.3.4. Les céramiques.....	14
II.2.3.5. Les composites	14
II.3. LES SUBSTITUTS OSSEUX UTILISES EN CHIRURGIE A MINIMA.....	17
II.3.1. Les ciments osseux injectables	18
II.3.1.1. Les polyméthylméthacrylates (PMMA)	18
II.3.1.2. Les ciments à base de sulfates de calcium, CaCO ₄	19
II.3.1.3. Les ciments osseux phosphocalciques (CPCs) : MCPC®	19
II.3.1.4. Les ciments composites.....	20
II.3.2. Les suspensions granulaires phosphocalciques injectables	20
II.3.3. Généralités : Les céramiques phosphocalciques.....	22
II.3.4. Catégories des céramiques phosphocalciques utilisées en réparation osseuse.....	23
II.3.4.1. L'hydroxyapatite (HA).....	23
II.3.4.2. Le phosphate tricalcique β (β-TCP):.....	23
II.3.4.3. Les biocéramiques phosphocalciques biphasées (BCP)	23
II.3.5. Evénements cellulaires suivant l'implantation d'une céramique phosphocalcique	24
II.3.6. Notions et concept de bioactivité.....	24
II.3.7. Adsorption de protéines : Mouillabilité et potentiel zeta.....	25
II.3.8. Fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques.....	26
II.3.8.1. Les systèmes de libération de principes actifs : Drug delivery system DDS	26
II.3.8.1.1. Les antibiotiques	27
II.3.8.1.2. Les facteurs de croissance	27
II.3.8.1.3. Les biphosphonates	27
II.3.8.1.4. Les anti-tumoraux	28
II.3.8.2. Adaptation de la radiopacité de céramiques phosphocalciques	28
II.3.9. Effets taille et forme de particules.....	29
II.3.10. Méthodes de mise en forme de granulés de céramiques de phosphate de calcium	30
II.3.10.1. Préparations sèches, sans addition d'un agglutinant, diluant ou liquide de mouillage.....	31
II.3.10.2. Préparations humides par addition d'un agglutinant, diluant ou liquide de mouillage	31
III. CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	33
III.1. INTRODUCTION	33
III.2. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES MATERIAUX PHOSPHOCALCIQUES	33
III.2.1. Diffraction des rayons X.....	33
III.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.....	34
III.2.3. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	34
III.2.4. Spectroscopie en dispersion d'énergie des rayons X (EDXS)	35
III.2.5. Analyse d'image	35
III.2.6. Microscopie Electronique à Transmission (MET).....	36
III.2.7. Charge de surface et potentiel zeta	37
III.3. CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES IN VITRO DES MATERIAUX PHOSPHOCALCIQUES.....	38
III.3.1. Cytotoxicité, Norme ISO 10993-5 :	38
III.3.1.1. Conditions de culture.....	39

III.3.1.2.	Préparation de l'extrait	39
III.3.1.3.	Contact direct	39
III.3.1.4.	Méthodes de détermination de la cytotoxicité	39
III.3.2.	<i>Différenciation cellulaire</i>	40
III.3.3.	<i>Etude de l'effet bactéricide et/ou bactériostatique de céramiques phosphocalciques</i>	41
III.4.	CARACTERISATIONS BIOLOGIQUES <i>IN VIVO</i> DES MATERIAUX APRES IMPLANTATION : HISTOLOGIE.....	42
III.4.1.	<i>Modèles animaux</i>	42
III.4.2.	<i>Préparation des tissus</i>	42
III.4.2.1.	Fixation / Déshydratation, Imprégnation / Inclusion	42
III.4.3.	<i>Les différents techniques histologiques dans l'analyse d'un tissu osseux</i>	43
III.4.3.1.	Lumière polarisée	43
III.4.3.2.	Pentachrome de MOVAT	43
III.4.3.3.	Hématoxyline Eosine Safran (HES)	44
III.4.3.4.	Phosphatase acide tartrate résistante (TRAP)	44
III.4.4.	<i>Histomorphométrie</i>	45
III.5.	CONCLUSION	46
IV.	CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	47
IV.1.	ELABORATION ET CARACTERISATION DE GRANULES DE CERAMIQUE MICROPOREUX	48
IV.1.1.	<i>Essais de mise en forme de granules ronds de céramique de phosphate de calcium</i>	48
IV.1.1.1.	L'atomisation	48
IV.1.1.2.	Lit fluidisé	52
IV.1.2.	<i>Caractérisations physico-chimiques de granules ronds en céramique de phosphate de calcium</i> 53	
IV.2.	EVALUATION DE LA REPOUSSE OSSEUSE D'UN MATERIAU PHOSPHOCALCIQUE BIPHASE CONTENANT DES NANO- MICRO-PARTICULES ET DES GRANULES MACRO- MICRO-POREUX	57
IV.2.1.	<i>Introduction</i>	57
IV.2.2.	<i>Article</i>	59
IV.2.3.	<i>Discussion</i>	60
IV.2.4.	<i>Conclusion</i>	62
IV.3.	OPTIMISATION DES SUSPENSIONS GRANULAIRES PHOSPHOCALCIQUES INJECTABLES : LES POLYMERES 63	
IV.3.1.	<i>Projet NewGel</i>	64
Biocompatibilité et performances du composite NewGel : études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	65	
IV.3.1.1.1.	Objectifs	65
IV.3.1.1.2.	Matériels et méthodes	65
IV.3.1.1.3.	Résultats	67
IV.3.1.1.4.	Conclusion	73
IV.3.1.1.5.	Brevet NewGel : « Hydrogel et ses applications biomédicales » (PCT/EP2007/062470).....	74
IV.3.2.	<i>Projet CitaGel</i>	75
IV.3.2.1.	Introduction	75
IV.3.2.2.	Biocompatibilité et performances du composite CitaGel : études <i>in vivo</i>	76
IV.3.2.2.1.	Objectifs	76
IV.3.2.2.2.	Matériels et méthodes	76
IV.3.2.2.3.	Résultats	76
IV.3.2.3.	Conclusion.....	79
IV.4.	AMELIORATION DE LA RADIOPACITE DES MATERIAUX INJECTABLES A BASE DE GRANULES DE BCP ..	80
IV.4.1.	<i>Introduction</i>	80
IV.4.2.	<i>Optimisation de la radiopacité d'un substitut injectable (MBCP Gel®) pour la réparation osseuse à minima</i>	81
IV.4.2.1.	Introduction	81
IV.4.2.2.	Matériels et méthodes.....	81
IV.4.2.3.	Résultats	81
IV.4.2.4.	Conclusion.....	83
IV.4.3.	<i>Mise au point de granules de phosphate de calcium biphasés intégrant des composés radiopaques</i>	84
IV.4.3.1.	Introduction	84
IV.4.3.2.	Matériels et méthodes.....	84
IV.4.3.2.1.	Elaboration du phosphate de calcium radiopaque	84
IV.4.3.2.2.	Etude de la cytotoxicité des composés radiopaques utilisés.....	84
IV.4.3.2.3.	Caractérisations des granules de phosphate de calcium radiopaques	85
IV.4.3.2.4.	Expérimentation animale	85
IV.4.3.2.5.	Histologie.....	85
IV.4.3.3.	Résultats	85

IV.4.3.3.1.	Cytotoxicité.....	85
IV.4.3.3.2.	Diffraction X et IRTF	86
IV.4.3.3.3.	Microstructure des granules radiopaques	88
IV.4.3.3.4.	histomorphometrie	89
IV.4.3.3.5.	Histologie.....	90
IV.4.3.3.6.	Radiographies	91
IV.4.3.4.	Conclusion.....	92
IV.4.3.5.	Brevet : « Substitut osseux comprenant un agent de contraste, son procédé de préparation et ses utilisation » (PCT/EP2008/064229).....	93
V.	DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	94

I. PREAMBULE

Le domaine d'application des biomatériaux est vaste et représente un marché économique de grande ampleur. Les biomatériaux de structure pour remplacer les tissus durs tels que l'os ou les dents sont une part importante de ce marché. En effet, les maladies articulaires et bucco-dentaires touchent des millions de personnes et le vieillissement croissant de la population mondiale en font un enjeu majeur de Santé Publique.

Depuis plusieurs décennies, les progrès en médecine et en sciences ont abouti à de nouveaux matériaux pour prévenir certaines pathologies associées au tissu osseux. Ces matériaux sont généralement métalliques [titane, acier inoxydable (prothèses, ostéosynthèses)], en polymère [collagène, polyéthylène, éther de cellulose... (vis d'interférence, cages de fusion, ostéosynthèses...)] ou en céramique [phosphates de calcium, sulfates de calcium... (blocs, granulés, suspensions, pâtes, revêtements)].

Parmi les biomatériaux en céramique, ceux en phosphate de calcium ont une place particulière. En effet, leur composition chimique proche de la phase minérale de l'os et des dents les rendent parfaitement biocompatibles. Leurs propriétés chimiques, structurelles, leurs formes galéniques adaptables à la technique chirurgicale et au site implantaire, leurs associations possibles à des agents thérapeutiques ou à des polymères en font aujourd'hui des matériaux de référence possédant d'excellentes propriétés ostéogéniques et/ou mécaniques et adaptés à l'indication chirurgicale.

Dans un **premier chapitre** bibliographique, nous ferons un rappel sur les propriétés du tissu osseux, sa composition, sa structure ou encore ses mécanismes de régénération. La définition d'un biomatériau, un rappel sur les paramètres d'interaction avec le milieu d'implantation ainsi que des notions comme la biocompatibilité ou la bio-fonctionnalité et une revue des principaux matériaux utilisés en chirurgie du tissu osseux seront par la suite abordés. Nous ferons ensuite un rappel sur les substituts osseux injectables dans le cadre de la chirurgie mini-invasive comme les ciments en vertébroplastie ou les suspensions particulières dans d'autres indications. En clôture de la dernière partie de ce premier chapitre d'introduction, nous traiterons des céramiques de phosphate de calcium ; ses propriétés chimiques et structurales, le concept de bioactivité, sa fonctionnalisation et de l'importance des formes et tailles particulières.

Dans le **second chapitre** nous aborderons les matériels et les méthodes utilisés lors de la caractérisation de nos matériaux : caractérisations intrinsèques par techniques physico-chimiques et caractérisations biologiques par techniques biochimiques, histologiques et histomorphométriques.

Dans le **troisième chapitre**, nous présenterons les résultats obtenus suite à nos travaux dans le cadre de l'essor du « granule concept » et des technologies à minima pour la reconstruction osseuse. En effet, dans ce contexte, les cliniciens favorisent le développement de matériaux performants qui rassemblent à la fois : *Ostéogénicité* (composition chimique, micro-structure, taille), *Injectabilité* (pâtes, taille et forme de la phase particulaire, propriétés du vecteur d'injectabilité : polymère, ciments) et *Radiopacité* (indispensable pour des indications en vertébroplastie et obtenue par ajout de composés radiopaques).

Une première partie concernera l'élaboration et la caractérisation de granules microporeux de céramiques en phosphate de calcium biphasé développés pour la chirurgie à minima dans le cadre du « granule concept » proposé par Daculsi [1]. Dans une seconde partie, nous aborderons l'étude du comportement biologique d'un substitut osseux injectable moulable composé de plusieurs fractions de taille de particules de céramiques en phosphate de calcium biphasé et d'une solution aqueuse. Le postulat de cette étude repose sur le rôle attribué à différentes classes de taille de particules de céramiques phosphocalciques dans le phénomène de cicatrisation osseuse ; les particules inférieures à 10 µm favoriseraient un phénomène inflammatoire propice à l'activation des cellules ostéogéniques, puis par la suite, les particules résiduelles les plus larges permettent la croissance osseuse par phénomène d'ostéoconduction. Ce matériau est actuellement commercialisé par la société Biomatlante sous la marque commerciale Hydros®. Dans la troisième partie, l'objectif se développera autour de l'optimisation de suspensions granulaires et particulièrement la phase continue de ces suspensions. Les propriétés physico-chimiques de la phase continue sont primordiales et vont notamment influencer la rhéologie du matériau (injectabilité, tenue du matériau dans le défaut osseux) et / ou sa biodégradation. (i) Une matrice composée de plusieurs polymères, dont la propriété est d'être en même temps réticulable et stérilisable, a été développée. Cette matrice seule ou associée à une charge minérale de BCP a été testée et brevetée [2]. (ii) Des travaux préliminaires ont été lancés avec l'étude *in vivo* des propriétés biologiques d'un composite associant un polymère thermosensible réversible à une charge minérale de granules de BCP. Enfin la quatrième partie traitera de l'optimisation de la radiopacité des matériaux injectables à base de granules de phosphate de calcium. Deux méthodes de préparation ont été testées et

PREAMBULE

brevetées [3] [2] : (i) la première est basée sur la radiopacité de la phase vectrice du matériau. Le matériau contenant l'hydrogel (MBCP-Gel) est lyophilisé puis réhydraté à l'aide d'une solution iodée (du type Ioméron®). L'iode apporte la radiopacité et améliore les propriétés rhéologiques du matériau. (ii) La seconde méthode est à nouveau basée sur le « granule concept ». Elle consiste à la mise au point de granules de phosphate de calcium biphasé intégrant des composés radiopaques. Les performances ostéogéniques des granules ont été testées, seuls ou associés à d'autres matériaux « granule concept » comme ciment phosphocalcique (MCPC®) ou bien dans la matrice d'hydrogel thermosensible testée précédemment.

Enfin dans le quatrième chapitre nous concluons, discuterons des perspectives à venir concernant de nouveaux concepts de biomatériaux pour la reconstruction osseuse.

II. CHAPITRE 1 : Revue bibliographique

Depuis plus de 500 millions d'années, une multitude d'organismes pluricellulaires produisent des structures minéralisées. Ces structures se sont formées pour remplir diverses fonctions [4]. Chez les vertébrés, le composant minéral principal est le phosphate de calcium apatitique. Il est présent dans les tissus durs comme les os ou les dents. L'os compose le système squelettique impliqué dans la protection et le mouvement du corps. Au niveau cellulaire, le tissu osseux produit la moelle osseuse. C'est également un réservoir minéral qui régule l'homéostasie du calcium et du phosphate circulant. De plus, par le biais d'une machinerie physico-chimique et cellulaire complexe, les structures osseuses s'adaptent à leur environnement.

II.1. Organisation et composition du tissu osseux

Macroscopiquement, on distingue l'os cortical ou os compact et l'os trabéculaire constitué de travées déterminant des cavités riches en cellules souches hématopoïétiques. Microscopiquement le tissu osseux est constitué d'une matrice extracellulaire (MEC) formée principalement par le collagène de type I et de cellules spécialisées : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que.

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)

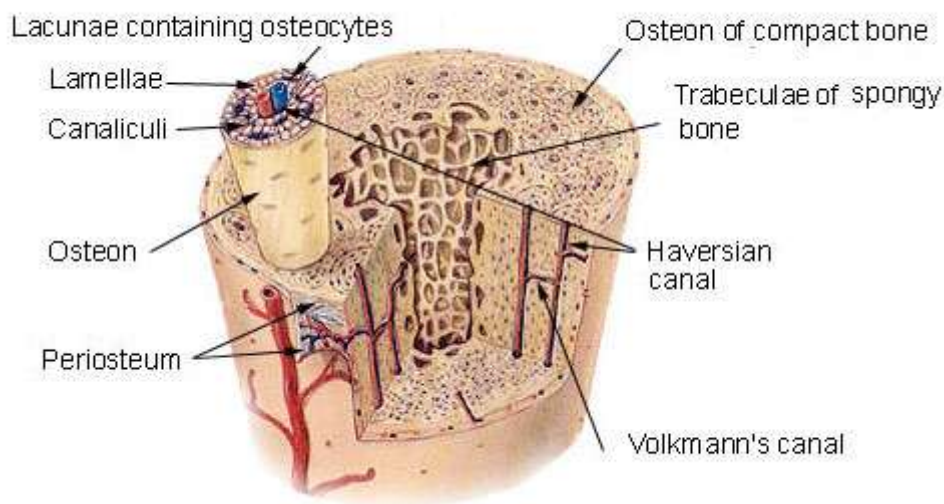


Figure 1 : Structure d'un os long

II.1.1. La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC peut-être subdivisée en deux fractions, la matrice organique (22%) et la matrice inorganique (69%) [5].

La matrice organique : Elle forme l'ostéoïde composé de protéines fibreuses structurales ou adhérentes (collagène de type I, élastine ou fibronectine) et de la substance interfibrillaire formée de glycosaminoglycanes (GAG) et protéoglycanes.

La matrice inorganique : L'os est un réservoir métabolique de sels minéraux. Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27%) et le phosphore (12%) qui précipitent sous forme de cristaux d'hydroxyapatite mal cristallisés $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ dans un ratio égal à 1,66. Ces cristaux se fixent entre et sur les fibres de collagène assurant la minéralisation de l'ostéoïde procurant la dureté et la rigidité du tissu osseux.

II.1.2. Les cellules osseuses

Il existe quatre types de cellules osseuses impliqués dans le remodelage osseux (tableau 1) : les cellules osseuses ostéoprogénitrices, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes.

Les cellules ostéoprogénitrices : Elles dérivent des cellules souches mésenchymateuses qui jouent un rôle prépondérant dans la formation, la cicatrisation et le remodelage osseux et qui peuvent se différencier en ostéoblastes ou ostéocytes.

Les ostéoblastes : Ils existent sous plusieurs états de développement qui modifient leur fonction et leur phénotype. (i) Les *ostéoblastes actifs* sont des cellules mononuclées cuboïdes, polarisées et riche en phosphatase alcaline. Ils synthétisent et sécrètent du collagène de type I et des glycoprotéines (ostéopontines, ostéocalcines), des cytokines et des facteurs de croissance dans l'ostéoïde [6] [7] [8]. (ii) Les *ostéocytes* sont les ostéoblastes matures enfermés dans la matrice et responsable de l'entretien et l'homéostasie osseux.

Les ostéoclastes : Ces cellules dérivent des cellules souches hématopoïétiques qui se différencient selon la lignée des monocytes/macrophages. Elles sont responsables de la résorption osseuse par acidification de la fraction minérale de l'os entraînant sa dissolution et par dégradation enzymatique de la matrice déminéralisée [6].

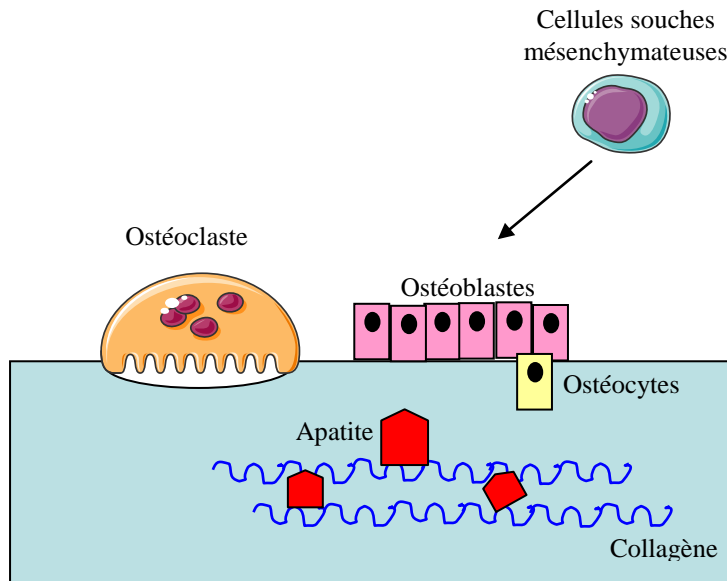


Figure 2 : Schématisation des éléments constitutifs du tissu osseux [7].

Nom	Fonction	Marqueurs	Origine
Ostéoprogéniteurs	Prolifération intense Différenciation vers les lignées osseuses	Phosphatase alcaline Collagène de type I Ostéocalcine Ostéopontine	Mésenchyme
Ostéoblastes	Cellules non prolifératives Hautement différenciées Minéralisation osseuse	Phosphatase alcaline Phosphate de calcium Ostéocalcine Ostéopontine	Mésenchyme
Ostéoclastes	Résorption osseuse Activation des ostéoblastes	TRAP	Hématopoïétique

Tableau 1 : Les cellules osseuses, leurs fonctions et marqueurs.

II.1.3. Remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant renouvellement, qui passe par des phases de formation et de résorption que l'on appelle remodelage. Ce processus contribue à améliorer les fonctions

mécaniques et métaboliques. Les unités de remodelage ne sont pas synchrones ce qui permet d'adapter la quantité et l'architecture de l'os, en fonction de facteurs systémiques (PTH, Vit. D) ou locaux (micro-traumatismes). Les séquences du remodelage osseux sont les suivantes :

Initiation: Mécanotransduction dans ostéocytes, signal aux ostéoblastes. Ceux-ci sécrètent des métallo protéinases qui « décapent » l'os localement.

Résorption: Migration de monocytes de la moelle, différenciation en ostéoclastes et destruction locale de l'os minéralisé (lacune). La résorption libère des ostéocytes et des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice.

Réversion: Les cellules ostéoprogénitrices (dont les ostéocytes libérés) se différencient en ostéoblastes et bloquent les ostéoclastes.

Synthèse: Les ostéoblastes synthétisent autour d'eux une matrice de collagène type I (ostéons), qui se minéralise en os. Les ostéoblastes sont ainsi séquestrés dans leur matrice [9].

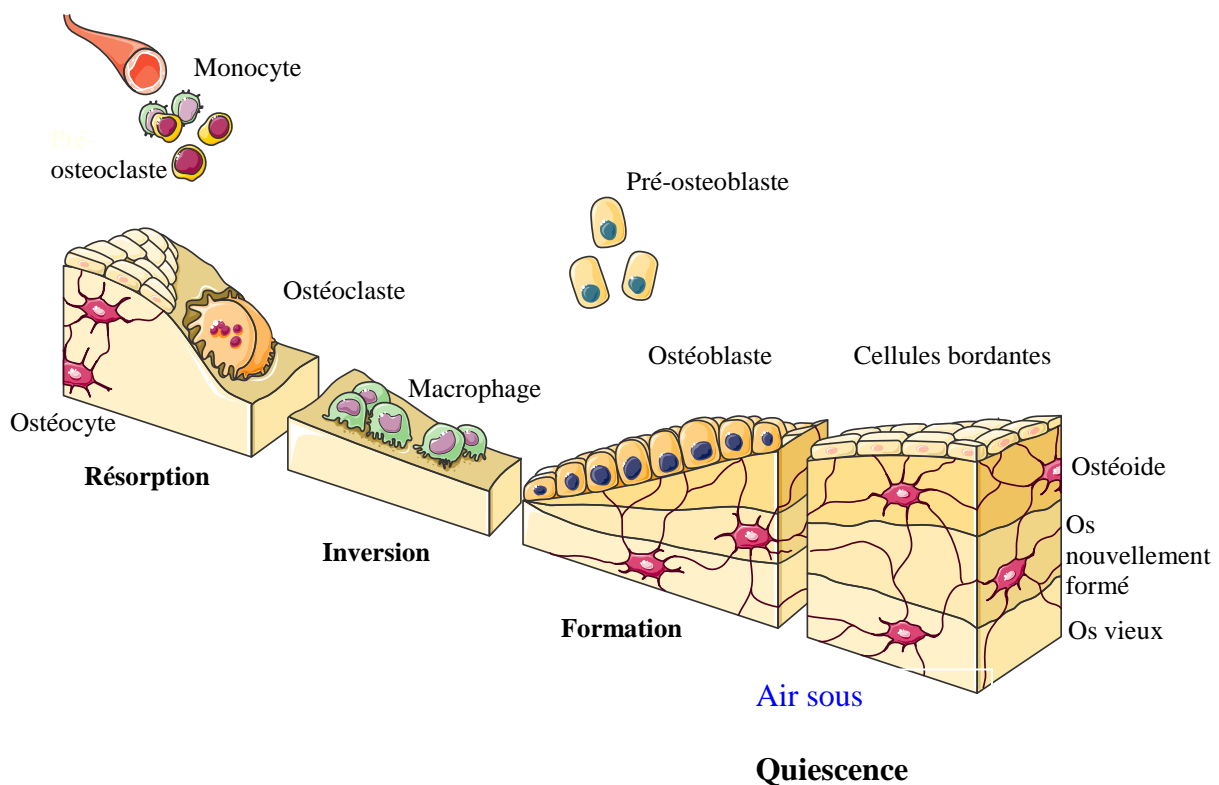


Figure 3 : Schéma du remaniement osseux. Le couplage entre la phase de résorption ostéoclasique et la phase de formation ostéoblastique permet un équilibre entre la quantité d'os résorbé et d'os formé [9].

II.1.4. Réparation spontanée du tissu osseux

Suite à une perte de tissu osseux, une cascade d'événements collaborent permettant une cicatrisation rapide de l'os. Dans un premier temps, les cellules sanguines (hématies et plaquettes), et des protéines forment un réseau de fibrine. Dans un second temps, des cellules sont recrutées pour initier la formation d'un tissu de transition appelé tissu de granulation. Cette seconde étape fait intervenir des macrophages qui nettoient le site, puis la néo vascularisation se met en place. Pour finir une nouvelle matrice s'initie composée de plusieurs protéines dont l'acide hyaluronique ou le collagène. Ce tissu hypertrophique est ensuite remplacé par un tissu osseux. Après un processus de guérison complet, les propriétés mécaniques et biologiques de l'os sont entièrement restaurées.

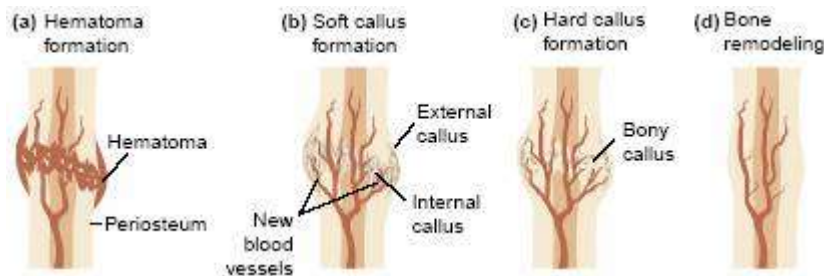


Figure 4 : Les étapes principales de la cicatrisation osseuse.

II.1.5. Des greffes osseuses aux matériaux synthétiques de substitution

Les traumatismes, les dérégulations hormonales ou les cancers peuvent entraîner d'importantes pertes de tissu osseux. Afin de remplacer et/ou consolider le tissu manquant, il peut être nécessaire d'apporter un matériau de comblement.

Différentes approches utilisent des matériaux d'origine biologique ou bien des substituts osseux synthétiques [10]. L'utilisation des greffes osseuses biologiques demeure majoritaire.

On distingue principalement deux types de greffes osseuses : l'autogreffe et l'allogreffe. (i) L'autogreffe, considéré comme le « gold » standard des greffes osseuses car le plus anciennement et le plus couramment utilisé [11], possède un grand potentiel ostéogénique et n'induit pas de réponse immunitaire de rejet. Le greffon est prélevé sur le patient, le plus souvent au niveau de la crête iliaque mais aussi sur la partie distale du fémur et est ensuite réimplanté au niveau du site receveur [12]. Cependant, la nécessité d'un second site chirurgical peut entraîner des complications (morbidité) et les quantités d'os disponibles sont limitées. (ii) L'allogreffe prise à partir de donneurs ou de cadavres, contourne les inconvénients de l'autogreffe. Néanmoins ce type de greffe présente le risque de transmission de pathogènes (virus, prions) ; Il est estimé que le risque de transmission du VIH est de 1 pour

1,6 million [13]. Afin de minimiser ces risques, différents traitements sont appliqués aux allogreffes comme la congélation, la stérilisation par irradiation ou vapeur d'oxyde d'éthylène, néanmoins ceux-ci peuvent altérer les propriétés biologiques et / ou mécaniques du tissu et entraînent d'importants coûts.

Les inconvénients liés aux greffes osseuses d'origine biologique ont incité les communautés scientifiques et médicales à développer des matériaux alternatifs aux greffes osseuses d'origine biologique.

II.2. Généralités sur les Biomatériaux

II.2.1. Introduction

Le remplacement de parties anatomiques et spécifiquement des tissus durs par des matériaux synthétiques ou naturels est depuis longtemps connu. Les Etrusques avaient déjà appris à remplacer les dents manquantes par des bridges taillés dans des os bovins. Au 17^{ème} siècle, on retrouve également des écrits concernant la greffe d'un os crânien de chien sur un soldat blessé à la tête. En 659 AD, les Chinois utilisaient déjà des amalgames dentaires pour soigner des caries, et les civilisations pré-colombiennes se servaient de feuilles d'or pour fermer les trous béants laissés par les trépanations. De nombreuses autres tentatives d'implantations ont été effectuées mais la plupart ont échoué, et ce notamment dû au manque d'asepsie et/ou de connaissances sur la toxicité des matériaux utilisés. Il faudra attendre la fin du 19^{ème} siècle pour voir apparaître des matériaux et des conditions adaptées à l'implantation de matériaux pour la reconstruction de tissus durs [7].

II.2.2. Définition

La définition du Biomatériau est complexe et évolutive [14] [15]. Cependant, la plus satisfaisante semble être celle soumise en 1982 lors de la conférence de consensus de l'Institut National de la Santé (NIH) aux Etats-Unis :

Biomatériau : «un biomatériau est un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou combiné avec un principe actif, comme partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte, tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant sa durée de service in vivo» [16].

II.2.2.1. Biocompatibilité

La notion de biomatériaux est entièrement contenue dans la nécessaire prise en compte du contact entre ces matériaux et le tissu osseux environnant. En relation directe avec cet aspect, la notion de biocompatibilité est essentielle. Soit, classiquement la biocompatibilité "négative", définie par les propriétés que le matériau ne doit pas avoir (pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité, ...), soit, à la suite d'une évolution plus récente, la biocompatibilité élargie (et si possible mesurable), définie comme « la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique ». Cette biocompatibilité "élargie" débouche sur la notion très actuelle de "bioactivité", par laquelle on souhaite que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais au contraire interagisse avec le tissu vivant. C'est par exemple le cas les matériaux ostéogéniques qui facilitent la croissance osseuse [16]. Dans le tableau 2 sont résumées les différentes réponses biologiques pouvant être générées par l'interaction matériaux/tissus vivants et l'importance de prendre en compte la notion de biocompatibilité.

Adsorption des protéines

Cytotoxicité

Activation des macrophages, production de cellules géantes, formation d'un tissu de granulation

Fibrose

Angiogénèse

Activation de la coagulation

Adhésion, activation et agrégation plaquettaire

Activation du complément

Réponse immunitaire, production d'anticorps

Hypersensibilité

Mutagénicité, génotoxicité

Cancérogénicité

Tableau 2 : Les différentes réponses biologiques possibles générées au contact du biomatériau implanté [17]

II.2.2.2. Bio-fonctionnalité

En fonction de leurs compositions et/ou indications, les matériaux utilisés en chirurgie de régénération osseuse doivent posséder à la fois bio-fonctionnalité et biocompatibilité. La bio-fonctionnalité concerne la capacité d'un implant à remplir la fonction pour laquelle il a été développé. Ces besoins sont les suivants : (i) *propriétés mécaniques* comme l'élasticité, la dureté, la résistance en compression, le module de Young (*i.e* : prothèses de hanche métalliques ou remplissage de vertèbres ostéoporotiques par un ciment acrylique) ; (ii) les *propriétés physique* comme la densité dans le cas d'implants orthopédiques ou l'expansion thermique des ciments osseux ; et (iii) la *chimie de surface* comme la résistance à la dégradation, oxydation, corrosion ou encore la capacité à former une interface osseuse dans le cas des prothèses de hanche, ostéosynthèses osseuses métalliques et des matériaux de comblement osseux de type céramiques phosphocalciques [18]. Les principaux paramètres physico-chimiques influençant la réponse devant être pris en compte sont référencés dans le tableau 3.

Composition, micro- nano-structure, morphologie

Cristallinité et cristallographie

Elasticité

Taux d'hygrométrie, hydrophobicité et hydrophilicité

Macro-, micro et nano-porosité

Composition chimique de surface

Topographie de surface

Energie de surface

Polarisation de surface

Paramètres de corrosion, libération d'ions (métaux)

Dégradation et produits de dégradation, lessivage (polymères)

Dissolution/dégradation, toxicité des produits de dégradation (céramiques)

Libération de débris

Tableau 3 : Les principaux paramètres physico-chimiques du matériau influençant la réponse hôte [17]

II.2.3. Les Biomatériaux de référence

Le nombre et la variété des biomatériaux implantés en chirurgie réparatrice sont importants. Dans le domaine de la reconstruction des tissus durs uniquement [17], cette diversité est toute aussi importante et l'on peut retrouver des matériaux d'origine variée comme :

- Les *matériaux d'origine naturelle* comme les greffes d'origine biologique, le collagène, les éthers de celluloses, les dérivés sanguins ;
- Les *métaux* comme le titane, les alliages de titane, l'acier inoxydable, les alliages cobalt-chrome ;
- Les *polymères* comme les poly (méthyl méthacrylate), les poly lactides, le poly éthylène haute densité ;
- Les *céramiques* comme les oxydes de zircon, l'oxyde d'alumine, les bioverres, les phosphates de calcium ;
- Les *composites* comme les revêtements biomimétiques en phosphate de calcium sur les implants métalliques ou les mélanges polymères / céramiques [7] (Tableau 4).

Chaque matériau possède ses forces et faiblesses. Certains sont résorbables, d'autres possèdent d'importantes propriétés mécaniques ou encore renferment un potentiel ostéogénique. Le choix pour un de ces matériaux ou de la combinaison de deux ou plusieurs de ces matériaux va dépendre de l'indication choisie notamment en rapport avec la zone traitée ou encore à la pathologie associée.

II.2.3.1. Les matériaux d'origine naturelle

Le souci de biocompatibilité des implants a tout d'abord conduit les chercheurs vers des matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle. On trouve parmi ceux-ci :

- Les greffes osseuses biologiques (autogreffes, allogreffes, xélogreffes) qui renferment naturellement le potentiel nécessaire à la repousse du tissu osseux mais dont l'utilisation pose un certain nombre d'inconvénients comme la morbidité, la diminution des performances liées aux traitements anti-infectieux, la possibilité de transmission de pathogènes...[13] [19] [20] [21] ;
- Les éthers de cellulose (méthyle celluloses : MBCP-Gel®) ou des dérivés sanguins (thrombine : Tricos®) notamment associée à des substituts osseux comme vecteur d'injection ;

- Le collagène, d'origine animale (extrait de la peau) ou humaine (extrait du placenta humain) disponible sous plusieurs formes et qui est notamment utilisé comme membrane anti-adhérente ou comme ostéosynthèse résorbable.

Malgré leur origine biologique qui leur confère de nombreuses propriétés intrinsèques favorables à leur intégration, ces matériaux peuvent, s'ils sont mal traités, conduire à des réactions biologiques à corps étranger.

II.2.3.2. Les métaux

Ces matériaux sont principalement utilisés pour leurs propriétés mécaniques élevées et leur relative inertie. Ceux-ci sont majoritairement utilisés en chirurgie orthopédique (prothèses de hanche, vis, ostéosynthèse...) et pour réaliser des implants dentaires grâce à leur bonne biocompatibilité. Néanmoins, certaines études de suivi de cas commencent à montrer les effets délétères induits par ces métaux autrefois dits inertes mais qui en réalité réagissent lentement avec leur environnement comme : la corrosion électrochimique et la durabilité, les mécanismes de dégradation non électrochimiques incluant les interactions protéine/métal, les réactions immunitaires et d'hypersensibilité, l'adaptation des propriétés mécaniques ou les propriétés de frottements et problèmes de débris. Notamment, la dégradation de la partie intra-fémorale des prothèses de hanche conduit à la libération de débris de très petite taille qui vont provoquer une réaction inflammatoire du tissu osseux suivi d'un phénomène d'ostéolyse [22] [23].

II.2.3.3. Les polymères

- Les *polymères* comme les poly (méthyl méthacrylate), les poly lactides, le poly éthylène haute densité. Les indications des polymères dans le domaine des biomatériaux osseux sont nombreuses. Le polyéthylène haute densité par exemple est utilisé pour recevoir les têtes de fémur des prothèses de hanches grâce à son faible coefficient de frottement. Avec ses propriétés d'injectabilité avant polymérisation, les résines acryliques possèdent des propriétés mécaniques élevées proche de celles de l'os notamment pour le module d'élasticité. Ces résines sont utilisées comme « colle » pour fixer les prothèses de hanche [24] et comme matériau de comblement et de consolidation pour les fractures de vertèbres ostéoporotiques [25]. De nouveaux polymères sont de plus en plus en plus utilisés, il s'agit des poly-lactides [26] [27]. Bien que non injectable, la résorption de ces matériaux est contrôlée par la

formulation qui contient des molécules de conformations différentes et qui s'hydrolysent en acide lactique. De plus leurs propriétés mécaniques sont élevées leur permettant des indications dans des régions osseuses fortement sollicitées comme le rachis. Enfin ils peuvent être composites en leur associant une charge minérale favorisant leur ostéointégration [28].

II.2.3.4. Les céramiques

Les céramiques se caractérisent par leur dureté et un comportement fragile, qui déterminent leurs domaines d'application. Elles incluent des oxydes, des sulfures, des borures, des nitrures, des carbures, des composés intermétalliques, ...

Dans le domaine des biomatériaux de reconstruction osseuse, on rencontre principalement l'alumine et la zircone utilisées dans les têtes de prothèses de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants dentaires. Il faut signaler tout particulièrement l'utilisation et le développement de céramiques à base de phosphate de calcium : l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique beta (β -TCP) et les biphasés (BCP) mélange des deux phases à différents ratios. En effet, ces matériaux, de part leur composition chimique, présentent l'avantage d'être biorésorbables, ostéoconducteurs et ostéogéniques. Leurs caractéristiques sont nombreuses (structure, micro-structure, forme, taille, composition...) qui conditionne la bioactivité au sein du tissu osseux environnement. Nous reviendrons plus en détail ces matériaux et leur spécificité. On peut ajouter à cette catégorie de matériaux, bien qu'ils s'en distinguent par maints aspects, les verres au phosphate, ou bioverres de Hench. Les principaux problèmes mal résolus avec les céramiques sont : la bioactivité, les mécanismes de dégradation, le contrôle du taux de résorption, les propriétés mécaniques et la densité.

II.2.3.5. Les composites

Le problème soulevé sur le fait qu'un biomatériau ne peut pas rassembler toutes les conditions requises pour une application ciblée a naturellement amené les chercheurs à développer des matériaux composites possédant à la fois les caractéristiques de plusieurs matériaux. Notons les prothèses métalliques recouvertes d'un revêtement biomimétique en phosphate de calcium pour une meilleure ostéointégration dans le tissu osseux. Plus récemment des matériaux en polylactides ont été chargés en phosphate de calcium qui permettait d'un côté d'apporter la résorbabilité et les propriétés mécaniques du polymère et le pouvoir ostéogénique de la céramique.

Composition	Type	Origine	Indications cliniques	Propriétés
Phosphate de calcium (hydroxyapatite, tricalcium phosphate β)	Céramique	Synthétique	Régénération osseuse, comblement osseux (ciments, granules, blocques, revêtements)	Ostéogénicité, bioactivité, résorption contrôlée
Phosphate de calcium + silicate	Bioverre	Synthétique	Idem	Bioactivité, biodégradation
Alumine	Céramique	Synthétique	Prothèses articulaires (genoux, hanche)	Importantes propriétés mécaniques, absence d'ostéointégration
Titane et alliages	Métal	Synthétique	Ostéosynthèses, prothèses de hanche et dentaire, cage de fusion	Absence de corrosion, importantes propriétés mécaniques
Inox et alliages de chrome et cobalt	Métal	Synthétique	Idem	Corrosion sur le long terme
PMMA	Polymère	Synthétique	Comblement osseux, vertébroplastie, fixation de prothèse	Non dégradabile
Polyesters (acide poly lactique/glycolique,	Polymère	Synthétique	Ostéosynthèses biodégradables, fil de suture,	Importantes propriétés mécaniques et

poly uréthane)			DDS	contrôle de la résorption
Poly éthylène haute densité	Polymère	Synthétique	Articulation de prothèses	Coefficient de frottement élevé Mécanisme de dégradation
Polyphosphazène	Polymère	Synthétique	DDS	favorable à la stabilité de l'implant
Polyanhydride	Polymère	Synthétique	DDS, Réparation tissulaire	Idem
Corail	Minéral	Naturel	Comblement osseux	Interconnections, biodégradable
Os	Composite minéral/protéines	Naturel (humain, bovin)	Idem	Composition similaire au receveur
Matrice osseuse déminéralisée (DBM)	Protéines	Naturel (humain)	Comblement osseux, régénération du cartilage	Biodégradable, source naturelle de protéines ostéoinductives
Collagène	Protéine	Naturel (bovin, porcin)	Régénération des tissus mous et durs	Biodégradable
Acide hyaluronique	Polysaccharide	Naturel (humain)	Régénération des tissus mous	Biodégradable, injectable.
Alginate / Agarose	Idem	Naturel (algue)	Idem	Dégradable, DDS
Chitosan	Idem	Naturel (carapace de crustacées)	Idem	Structure similaire aux protéines du cartilage
Fibrine	Protéine	Naturel	Comblement	

	(humain)	osseux
--	----------	--------

Tableau 4 : Catégories et indications des biomatériaux utilisés en réparation osseuse [7].

II.3. Les substituts osseux utilisés en chirurgie à minima

Les nouvelles techniques chirurgicales, contrairement à la chirurgie « à ciel ouvert » classique, veulent être les moins invasives possibles. Le but est de réaliser les mêmes gestes thérapeutiques tout en diminuant le traumatisme opératoire. La minimalisation des incisions pariétales permet en effet de diminuer la durée de l'acte thérapeutique, le saignement opératoire, les douleurs postopératoires, le temps d'hospitalisation et de la phase de convalescence [29]. La prise en charge suite à ces actes est de plus en plus coûteuse et justifie le développement de techniques et de matériaux capables de diminuer ces coûts. Dans le domaine de réparation osseuse, les fractures vertébrales ostéoporotiques ont, par exemple eu un coût total (morbidité, qualité de vie, désordres psychologiques, taux de mortalité) estimé en 2005 à environ 1,4 milliards de dollars US [30] [31] [32]. Une des indications les plus répandue et nécessitant le développement de matériaux injectables en chirurgie du rachis [33] est la **technique de vertébroplastie** introduite par Galibert et Deramond en 1987 [34]. C'est une procédure radiologique qui permet d'obtenir un effet antalgique immédiat et une consolidation de la vertèbre suite à une fracture traumatique (tassement) et/ou pathologique (ostéoporose, métastases, myélome) du corps vertébral. Elle consiste à stabiliser le corps vertébral, par injection, à travers une aiguille (10 à 15 gauges), d'un « ciment » à l'intérieur de la fracture vertébrale [35]. La kyphoplastie est une variante de la vertébroplastie par ajout d'une étape qui consiste à rétablir la hauteur vertébrale. Différentes classes de matériaux ont été développées pour cette indication. D'autres applications de réparation du tissu osseux par voie mini-invasive en chirurgie orthopédique, stomatologie ou chirurgie dentaire ont également été développées avec cependant des contraintes différentes. Parmi ces matériaux on retrouve les « ciments » osseux (parmi lesquels les ciments acryliques, les ciments à base de phosphates de calcium, les sulfates de calcium ou les composites) et les suspensions phosphocalciques injectables (MBCP-Gel®, Hydro's®).

Selon les indications, les contraintes répertoriées et rencontrées en chirurgie de réparation osseuse, le substitut osseux idéal doit posséder l'ensemble des caractéristiques présentées dans le tableau 5 [36]. Aucun matériau ne pouvant posséder toutes ces propriétés, les chercheurs se sont focalisés les plus importantes, à savoir : l'ostéogénicité, la

biocompatibilité, la biofonctionnalité, le taux de résorption, l'injectabilité et les propriétés mécaniques et la radiopacité [36].

Radiopacité suffisante

Prêt à l'emploi

Injectabilité aisée

Faible température de prise

Mélange compris entre 6 et 10 minutes

Temps de prise d'environ 15 minutes

Propriétés mécaniques suffisantes

Cohésion

Viscosité adaptée

Microporosité (<10 µm) permettant la circulation des fluides

Macroporosité (>100 µm) nécessaire à l'invasion en profondeur du tissu osseux

Non cytotoxique

Contrôle de la résorption

Ostéoconducteur

Ostéoinducteur

Biocompatible

Bioactif

Faible coût

Tableau 5 : Propriétés du substitut osseux idéal [36].

II.3.1. Les ciments osseux injectables

II.3.1.1. Les polyméthylméthacrylates (PMMA)

Bien que ce ne soit pas sa vocation première le ciment acrylique peut être utilisé comme substitut osseux dans certaines conditions. Ce produit est le résultat du mélange de deux composants le premier étant une poudre constituée d'homopolymère de méthyl-méthacrylate (MMA) qui peut également contenir un agent opacifiant (sulfate de baryum ou oxyde de zirconium) et un initiateur de la réaction de polymérisation (peroxyde de benzoyle). Le deuxième composant est un liquide correspondant à la forme monomérique de MMA. Ces ciments sont utilisés depuis les années 60 en orthopédie notamment pour le scellement et les reprises de prothèses [37]. Ce matériau est considéré comme bio-inerte et montre une bonne

biocompatibilité sur le long terme. Depuis le milieu des années 80, ces ciments sont utilisés pour le traitement de fractures pathologiques des corps vertébraux. Le matériau est très utilisé du fait qu'il présente les avantages d'être bien identifié, d'être facile d'utilisation, de posséder d'excellentes propriétés mécaniques (résistance en compression proche de celle de l'os trabéculaire, 80 MPa), et enfin d'être peu onéreux. Cependant, sa bio-inertie ne permet pas une bonne intégration au tissu osseux environnant, sa dureté provoque des fractures des vertèbres adjacentes dues à une mauvaise répartition des charges, sa température de prise élevée entraîne des nécroses ainsi que des risques de cytotoxicité et d'embolies [38] [39].

II.3.1.2. Les ciments à base de sulfates de calcium, CaCO₄

Plus connu sous le nom de « plâtre de Paris » ou Gypse, le sulfate de calcium fut proposé la première fois par Dreesmann en 1892 [40] et développé en suite par Peltier en 1961 [41]. Dans sa formulation originale, la recristallisation du plâtre de Paris après son mélange à l'eau est aléatoire et ne permet pas le contrôle de sa résorption. Récemment, un grade médical de ce matériau a été développé : la poudre de sulfate de calcium hémi-hydraté est hydratée et convertie en sulfate de calcium dihydraté produisant une pâte avec une structure solide selon la réaction suivante [42] : $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} + 1,5 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Implanté en site osseux ce matériau génère un environnement faiblement acide favorable à l'angiogénèse et à l'ostéogénèse qui permet une repousse osseuse à son dépend [43]. La résorption de ce matériau est rapide et ne nécessite que quelques semaines selon le volume et le site implanté, cependant sa résistance en compression est faible, de l'ordre de 0,2 MPa [44].

II.3.1.3. Les ciments osseux phosphocalciques (CPCs) : MCPC®

A la demande des praticiens, les ciments phosphocalciques sont une thématique relativement récente sur laquelle travaillent les chercheurs [45] [46] [47] [48]. Théoriquement ces matériaux sont très prometteurs : injectables, propriétés mécaniques élevées, macroporeux, radiopaques, biocompatibles, résorbables, ostéogéniques. Dans la pratique, leur mise en œuvre est délicate. Les CPCs sont des ciments hydrauliques, obtenus par une réaction acide-base dans l'eau ou une solution aqueuse entre deux phosphates de calcium ; l'un acide, l'autre plus basique. Après mélange il en résulte un phosphate de calcium de basicité intermédiaire, moins soluble qui va précipiter. Cette réaction de prise est isothermique [49] éliminant le risque de nécrose osseuse rencontrée avec les ciments PMMA. Leur nature chimique proche de la partie minérale de l'os les rendent biocompatibles et ostéoconducteurs [50] [51] [52]. Il

existe deux groupes de CPCs définis selon leur vitesse de résorption : les ciments apatitiques et les ciments brushitiques (résorption : Hydroxyapatite < ciment apatitique < brushite). *In vivo* la brushite perd très tôt ses propriétés mécaniques, dues à son taux de dégradation élevé, néanmoins rapidement compensées par une repousse osseuse précoce [52]. Il existe des ciments qui possèdent des propriétés mécaniques initiales élevées (jusqu'à 50 MPa) [53]. Cela suggère néanmoins un matériau de densité élevée faiblement résorbable et peu compatible à une repousse osseuse au dépend du matériau. La difficulté est d'adapter un compromis entre propriétés mécaniques initiales élevées et résorbabilité qui permet un transfert de ces propriétés du matériau vers l'os néo-formé.

II.3.1.4. Les ciments composites

Ces matériaux sont composés d'une phase contenant un ciment acrylique additionné d'une phase en céramique de phosphate de calcium. Globalement, la fraction acrylique permet d'atteindre des propriétés mécaniques proches de l'os et la partie céramique fournit la bioactivité permettant l'ostéointégration du matériau. La prise en main et la manipulation de ce matériau sont aisées et proches du comportement des ciments acryliques. Des études ont confirmé la bioactivité et la biocompatibilité de ces composites, le tout associées à une température de polymérisation inférieure à celle des PMMA [54] [55] [56].

II.3.2. *Les suspensions granulaires phosphocalciques injectables*

Une suspension est un état d'un solide divisé, mêlé à la phase liquide (généralement moins dense que lui) sans être dissous par lui. Ces matériaux sont composés d'une phase non continue, (dans notre cas les particules de CaP), et d'une phase continue, le liquide (eau ou polymère).

Ces suspensions sont une alternative aux ciments osseux. Ils sont, contrairement aux ciments, prêts à l'emploi et faciles à injecter. Il s'agit de suspensions composées de granules de céramique phosphocalcique dans une solution aqueuse ou un polymère d'origine synthétique ou biologique. Leurs propriétés mécaniques sont faibles voir inexistantes. Néanmoins les espaces inter-grain apportés par le volume de polymère permettent, après lavage par les fluides biologiques, une colonisation en profondeur par les cellules osseuses et une repousse osseuse rapide apportée par la céramique [57] [58].

Trois substituts osseux ont été mis au point et dont la composition varie par le changement de la phase continu.

(i) La première génération de substituts osseux injectables (injectable bone substitute 1, IBS1), le MBCP Gel® (Biomatlante SAS) est un matériau non durcissant. Il s'agit d'une suspension associant des granules de BCP à un polymère hydrophile composé d'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC). L'IBS1 possède des propriétés rhéologiques permettant à la fois la cohésion des grains entre eux et une bonne perméabilité aux cellules. Sa formulation permet le comblement de cavités osseuses de formes complexes. La repousse osseuse est rapide et à lieu entre et sur les granules de céramiques et se propage par ostéoconduction permettant un rétablissement rapide des propriétés mécaniques naturelles de l'os [59] [60].

(ii) Le second matériau injectable IBS2 [61] est un composite auto-durcissant. Les granules de céramiques de BCP sont associés à un hydrogel silanisé HPMC-Si. Le durcissement de l'hydrogel résulte d'une réaction de réticulation entre les groupements silanes et les chaînes celluloses obtenue par diminution d'un pH basique à un pH physiologique [61] [62] [63]. Avant la réticulation, le composite se présente sous la forme d'un liquide visqueux injectable qui durcit *in situ* formant un gel chargé en granules. La bioactivité et l'ostéoconduction sont promues par les granules de BCP espacés par le gel. Ce matériau, à la fois injectable et réticulable, peut-être utilisé dans de nombreuses indications orthopédiques et maxillo-faciales pour la réparation osseuse [64]. Il possède également des propriétés mécaniques primaires et peut-être employé en association à des facteurs bioactifs.

(iii) Enfin le troisième matériau injectable est un mélange basé sur l'association de biocéramiques à de colle de fibrine. Les granules de phosphate de calcium ne sont pas faciles à manipuler et la mise en place et le maintien dans le défaut ne sont pas garantis. Dans ce contexte, les granules doivent être maintenus entre eux par un agent liant comme la colle de fibrine qui permet la stabilisation des granules au niveau du site d'implantation. Le composite est obtenu en mélangeant le fibrinogène et la thrombine (Tissel®, Baxter BioSciences BioSurgery) aux granules de BCP (TricOs®, Biomatlante). La thrombine est utilisée à basse concentration (4 UI) afin d'augmenter le temps de réaction de la réticulation. Le ratio volumique Tissel/TricOs est de 1/2. De nombreuses études précliniques ont été réalisées chez le lapin, la chèvre dans des modèles de biocompatibilité et de biofonctionnalité d'augmentation du plateau sinusien et de comblement d'os longs [65] [66] [67].

L'injectabilité et la rhéologie de ces matériaux peuvent être adaptées en faisant varier le taux de charge, la granulométrie, la forme particulaire et/ou les propriétés de la phase continue (ajout d'agents lustrants, de polymères, réticulation...etc).

La phase continue consiste donc en une solution aqueuse (dans le cas de l'Hydros®), un polymère généralement hydrophile (hydroxypropyl méthyl cellulose avec le MBCP-Gel®, copolymères réticulables par irradiations avec le NewGel®, poloxamères thermosensibles pour le CitaGel® ou polymère fonctionnalisé et réticulables par changement du pH avec l'IBS2) ou des glycoprotéines (Colle de fibrine, TricOsT® ; collagène). Un brevet a été déposé concernant le développement d'un hydrogel et ses applications biomédicales (déposant Biomatlante) [2]. L'hydrogel biodégradable et biocompatible possède les propriétés d'être stérilisable et de réticuler sous l'action de rayonnements ionisants. Dans le domaine des substituts osseux injectables et associé à des substituts osseux phosphocalcique, celui-ci donne au matériau, en plus d'être facilement stérilisable, des propriétés rhéologiques intéressantes d'injectabilité et de moulage.

La phase non continue (la charge minérale) est composée de granules de phosphates de calcium. Ces granules possèdent de multiples propriétés favorisant leur ostéointégration et qui peuvent être paramétrées en fonction du type d'indication. Le chapitre suivant détaille les caractéristiques des céramiques de phosphocalciques.

II.3.3. Généralités : Les céramiques phosphocalciques

Outre le développement en orthopédie de têtes fémorales en alumine puis par la suite en zircone au début des années 90, une nouvelle génération de matériaux de synthèse à base de phosphate de calcium a ouvert la voie au développement de matériaux bioactifs. Découvert il y a 150 ans, le nom « apatite » originaire du grec et signifiant « décevant » (car confondus avec des améthystes) leur avait été donné.

Ils sont désormais très largement utilisés en chirurgie orthopédique, du rachis, traumatologique, maxillo-faciale et dentaire [68] [69]. En effet leurs propriétés chimiques, biologiques et structurales, leurs biocompatibilité, bioactivité, biodégradabilité, biorésorbabilité et ostéoconductibilité sont idéals car proches de celles de la fraction minérale de l'os [70] [71] [72] [73].

II.3.4. Catégories des céramiques phosphocalciques utilisées en réparation osseuse

II.3.4.1. L'hydroxyapatite (HA)

De structure $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ l'hydroxyapatite est sur le plan chimique celui qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os. Il est le moins soluble de tous les phosphates de calcium synthétiques car il possède une cinétique de résorption lente avec un ratio Ca/P de 1,67. Cette faible dissolution, peu enclin à une repousse osseuse à son dépend, le rend cependant favorable pour supporter l'ostéoconduction, propriété nécessaire à la colonisation osseuse [74] [73].

II.3.4.2. Le phosphate tricalcique β (β -TCP):

De structure $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ le phosphate tricalcique β est rencontré dans les milieux biologiques mais substitués en magnésium, il est alors appelé Whitlockite et a été observé dans de nombreuses calcifications pathologiques et dans les caries. Son ratio Ca/P égale à 1,5 confère au β -TCP pur une importante solubilité [73]. Cette propriété participe à l'augmentation locale des concentrations en ions calcium et phosphate et entraîne des phénomènes de saturation permettant la re-précipitation d'apatite biologique carbonatée. L'élévation de concentration de ces ions entraîne également une diminution de l'activité ostéoclastique et la stimulation du remodelage osseux [75].

II.3.4.3. Les biocéramiques phosphocalciques biphasées (BCP)

Les BCP sont les biocéramiques les plus récentes qui allient les propriétés de l'hydroxyapatite et celles du phosphate tricalcique β . Grâce à l'ostéoconduction et la bio-dissolution, les BCP permettent au tissu osseux de progresser des berges du défaut vers l'intérieur de l'implant [76] [77]. Les propriétés, en particulier la bioactivité des BCP, peuvent être contrôlé en faisant varier la proportion en HA et en β -TCP. Cependant les bio-fonctionnalités initiales demeurent incomplètes comme des propriétés mécaniques faibles et une colonisation osseuse en profondeur réduite.

II.3.5. Événements cellulaires suivant l'implantation d'une céramique phosphocalcique

Les céramiques phosphocalciques provoquent une réponse des cellules osseuses comparable à celle provoquée par l'os. Ces matériaux permettent l'attachement, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les premiers événements qui suivent l'implantation d'une céramique biphasée correspondent au lavage par les fluides biologiques suivis de la colonisation cellulaire. : les monocytes / macrophages, les ostéoclastes pour la résorption, les fibroblastes et les cellules ostéogéniques pour la réparation tissulaire [78]. L'ostéogénèse et la résorption interviennent à la surface et à l'intérieur des macropores.

II.3.6. Notions et concept de bioactivité

Ce concept a été décrit pour la première fois en 1989 par Daculsi *et al* [79] et aujourd'hui encore c'est ce concept de dissolution et précipitation biologique qui est repris pour améliorer l'efficacité biologique des substituts osseux [80] [81]. Celui-ci est basé sur un équilibre entre la phase d'hydroxyapatite dite stable et celle plus soluble composée de phosphate tricalcique β . Après implantation d'une céramique phosphocalcique biphasée, le matériau soluble se dissout graduellement au contact des fluides biologiques entraînant le relargage d'ions calcium et phosphate. Les fluides biologiques se retrouvent saturés favorisant la précipitation d'apatite biologique à la surface de l'hydroxyapatite. La libération de ces ions permet le recrutement de cellules ostéogéniques permettant la formation d'un nouveau tissu osseux [82] [83] [84] [85]. Le principal intérêt des matériaux bioactifs comme le BCP consiste en leur capacité à former une interface directe avec le tissu osseux qui n'est pas retrouvée avec les biomatériaux inertes ou bio-tolérants qui forment une interface fibreuse [86] [87]. La continuité ainsi obtenue entre le tissu hôte et le biomatériau, favorise la colonisation cellulaire et la formation du tissu osseux. La résorption et la dégradation du substitut sont conduites respectivement par les cellules ostéoclastiques et macrophagiques [88]. L'intégration du biomatériau est totale. Les qualités biologiques, chimiques et mécaniques de la liaison obtenue à l'interface sont primordiales pour assurer l'ostéointégration de l'implant [89] [90]. Les deux paramètres qui caractérisent les BCP sont : sa chimie (principalement le rapport Ca/P) et ses paramètres physiques, (macro- et micro-structures). (i) La chimie : Le rapport Ca/P est inversement proportionnel au taux de dissolution de la céramique et donc de sa résorption. Comme nous l'avons montré, ce taux peut-être adapté en modifiant le rapport HA/TCP. (ii) la macro- micro-structure : Cette notion plus récente est primordiale. D'une

part, la macroporosité interconnectée (>300 µm) produite par un porogène éliminé durant la phase de frittage (naphthalène, urée...), permet la colonisation du matériau en profondeur. D'autre part la microporosité indispensable à la bioactivité des céramiques phosphocalciques. Elle permet d'adapter la surface d'échange entre la céramique et les fluides biologiques et donc d'adapter le niveau de bioactivité du matériau [91] ; plus la surface d'échange sera importante plus la céramique sera bioactive. Une céramique biphasée avec un ratio HA/TCP de 50/50 par exemple, n'aura pas la même bioactivité si elle est dense ou microporeuse. La microporosité va dépendre de la nature chimique de la céramique et des conditions de frittage. Une température élevée va entraîner la fermeture des pores, une diminution de la surface d'échange et une diminution de la bioactivité.

II.3.7. Adsorption de protéines : Mouillabilité et potentiel zeta

Les premiers évènements biologiques intervenants lors de l'implantation de biomatériaux concernent l'adsorption de protéines issues des fluides biologiques [92] [93] [94]. Les protéines adsorbées vont influencer la précipitation, la cristallisation et la minéralisation du tissu osseux [95] [96]. Elles influencent le comportement cellulaire et déterminent la biocompatibilité de l'implant. L'adsorption des protéines est un phénomène complexe qui est notamment déterminée par le pH, la composition ionique des fluides biologiques, la nature des protéines, la morphologie de la surface, le potentiel zeta et les groupements fonctionnels de l'implant [97] [98]. Selon leurs caractéristiques, les phosphates de calcium ont une capacité d'adsorber les protéines qui va varier en fonction de leur nature (ratio HA/TCP, microstructure...etc). Il est d'ailleurs généralement admis que la concentration élevée de molécules de signal comme les facteurs de croissance sont nécessaires à l'ostéogénèse des céramiques phosphocalciques [99]. Des études ont montré que la surface des céramiques phosphocalciques était très réactive et instable et ce en fonction de sa nature chimique et de son environnement (tableau 6) [100].

	Potentiel zeta (mV)	
	β-TCP	HA
Sec	-19	-11
Eau distillée	-7	-9
Milieu de culture (MEM)	-26	-29

Tableau 6 : Exemple de potentiels zeta mesurés sur différents types de céramiques phosphocalciques dans différentes conditions selon Suzuki [100].

L'adhésion et la croissance des cellules ont été étudiées en modifiant la surface de céramiques par greffage de groupements silanes pour comprendre les effets du potentiel zeta [101] [102] et de la mouillabilité [103] [101] [104]. L'hypothèse admise est que plus la charge négative à la surface des céramiques est importante, plus l'adhésion cellulaire est forte. Il a également été démontré que la mouillabilité était reliée à la densité ionique à la surface des matériaux. L'adhésion est augmentée en modifiant la surface par trempage des céramique dans un sérum riche en protéines, fibronectine et collagène respectivement [103]. Ces résultats suggèrent que la forte électronégativité de surface (potentiel zeta) est indispensable à l'absorption de protéines spécifiques pour augmenter l'adhésion.

II.3.8. Fonctionnalisation des céramiques phosphocalciques

II.3.8.1. Les systèmes de libération de principes actifs : Drug delivery system DDS

Les principes actifs ont longtemps été administrés par voie orale (sous forme solide ou liquide) ou par injection. Depuis 30 ans les principes actifs et les formulations se sont complexifiés et avec eux l'apparition de nouveaux impératifs comme le contrôle de la vitesse de libération ou le besoin d'intervenir spécifiquement sur un site particulier. Les nouvelles connaissances sur les mécanismes biochimiques et moléculaires et le développement de nouveaux traitements (découverte de molécules bioactives, thérapie génique) nécessitent de nouveaux moyens d'administration. Naturellement, se sont développés des systèmes implantables permettant la libération contrôlée et *in situ* d'agents thérapeutiques appelés DDS. Les céramiques phosphocalciques font parties des ces dispositifs médicaux fonctionnalisables. En effet leur structure et leurs propriétés chimiques en font des matériaux idéals pour l'adsorption et la libération de principes actifs. Des céramiques phosphocalciques (bloc, insert, coin, ciment ou granules) ont été chargés de facteurs de croissance comme les BMP (Bone Morphogenetic Protein) par adsorption du principe actif préalablement mis en solution [105]. Les molécules le plus souvent associées aux matériaux de substitution osseuse ont un but thérapeutique préventif ou curatif [106] soit dans l'objectif de favoriser la cicatrisation osseuse et/ou l'intégration biologique du matériau. L'implantation n'est

cependant pas limitée au milieu osseux et de nombreux autres principes actifs peuvent être libérés dans l'organisme.

II.3.8.1.1. Les antibiotiques

L'intérêt de l'utilisation des céramiques pour la libération d'antibiotiques date d'une dizaine d'année environ avec le développement de systèmes permettant la prophylaxie ou le traitement d'infections osseuses consécutives à des fractures, des traumatismes ou des interventions chirurgicales. Les matériaux ont été testés sous différentes formes comme des blocs, des granules ou encore des ciments [107] : des blocs associant l'arbécacine à l'hydroxyapatite ont été implantés chez l'homme avec succès.

II.3.8.1.2. Les facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissances impliqués dans le remodelage osseux sont désormais testés pour accélérer les processus de réhabilitation et de régénération osseuse.

Parmi ceux-ci le TGF- β (Transforming Growth Factor β) ou le b-FGF (Fibroblast Growth Factor) ont été associés avec succès à des revêtements apatitiques ou des blocs d'hydroxyapatite [108] [109]. Cependant, ceux-ci risquent de diffuser dans la circulation systémique de façon massive et de provoquer des effets indésirables importants, leurs utilisations en clinique humaine sont donc limitées.

Actuellement la société BioSet, spécialisée dans la production de peptides, est prête à lancer une vaste étude clinique dans l'indication de la fusion vertébrale. Elle a développé la synthèse d'un peptide qui permet d'amplifier la réponse à la BMP-2 : le B2A. La société Biomatlante leader et spécialiste des substituts osseux phosphocalciques a développé des céramiques spécifiques macro- micro-poreuse qui permettent une adsorption importante de ce peptide. Ce complexe est idéal à la régénération du tissu osseux [110].

II.3.8.1.3. Les biphosphonates

Les biphosphonates sont de puissants inhibiteurs de la résorption osseuse. Ils sont principalement utilisés dans le traitement de la maladie de Paget et de l'ostéoporose [111] toutes deux caractérisée par une résorption osseuse excessive. Leur association aux céramiques phosphocalciques est idéale dans certaines indications comme la vertébroplastie où il est nécessaire de combler, renforcer et traiter la vertèbre.

II.3.8.1.4.

Les anti-tumoraux

L'efficacité des traitements anti-tumoraux est généralement due à de fortes concentrations de substances anticancéreuses capables de détruire les cellules tumorales. Il a été envisagé d'associer ces molécules à des matrices phosphocalciques et de les utiliser après les résections osseuses afin de permettre une libération *in situ*.

Selon les pathologies et les indications, d'autres principes actifs peuvent être associés aux céramiques comme les hormones stéroïdiennes, les corticoïdes, les anticoagulants ou les analgésiques [112].

II.3.8.2.

Adaptation de la radiopacité de céramiques phosphocalciques

En fonction de l'application, les biomatériaux phosphocalciques doivent posséder des propriétés spécifiques. C'est le cas des procédures percutanées mini-invasives comme la vertébroplastie déjà décrite. Le matériau doit pouvoir être visualisé en temps réel sous fluoroscopie afin d'assurer sa localisation au niveau du site implanté et éviter sa fuite dans le canal rachidien. Ceci est rendu possible en l'« opacifiant ». Les PMMA dits « ciments acryliques » ne possèdent pas de propriétés contrastantes et afin d'adapter leur radiopacité, le praticien mélange le ciment à des poudres de matériaux radiopaques comme le sulfate de baryum, l'oxyde de zircon, du tungstène ou encore des monomères contenant de l'iode [113] [114]. Le caractère minéral des phosphates de calcium (ciment ou suspension phosphocalcique) leur donne des propriétés de radiopacité nettement supérieures aux ciments acryliques composés d'éléments légers comme le carbone, l'hydrogène ou l'oxygène. Comme les phosphates de calcium sont facilement détectables sur les radiographies, il est souvent admis qu'il n'est pas nécessaire de les rendre plus opaque. Cependant, la radiopacité nécessaire pour discriminer le tissu osseux du matériau phosphocalcique n'est pas toujours évidente en fluoroscopie. Une des approches développées est, tout comme les ciments acryliques, celle consistant à mélanger pendant la phase de prise du ciment des poudres de composés radiopaques. Cette méthode n'est pas satisfaisante car elle peut induire, particulièrement dans le cas des ciments phosphocalciques, des modifications physico-chimiques qui rendent les temps de prise aléatoires et diminuent le plus souvent les propriétés mécaniques [115] [116]. De plus les propriétés de résorptions de ces matériaux posent la question du devenir de ces agents contrastants et leur possible cytotoxicité locale ou systémique [117]. Une récente étude a cependant comparé sur le long terme la

biocompatibilité et les performances ostéogénitrices d'un ciment phosphocalcique (SRS®, Norian) à ce même ciment mélangé à du sulfate de baryum : les résultats montrent l'absence de cytotoxicité et une bonne ostéointégration [118]. Avec le « granule concept » développé par Daculsi, des granules de céramique phosphocalcique peuvent être ajoutés au ciment lui apportant des propriétés supplémentaires de bioactivité et d'ostéoconduction. Ces granules peuvent être fonctionnalisés et inclure des éléments minéraux lourds les rendant radiopaques ; la radiopacité du ciment est apportée par les granules de CaP qui ne modifie pas les caractéristiques du ciment. Deux voies distinctes sont étudiées pour ajouter ces éléments denses aux granules : (i) par synthèse d'apatite dopée par ces éléments (substitution atomique du calcium par le baryum ou le bismuth) ou (ii) par un mélange physique d'apatite à des poudres de minéraux lourds comme le sulfate de baryum ou des oxydes de terres rares céramisé à haute température [119]. De même, les suspensions phosphocalciques, généralement moins denses que les ciments, ont besoin d'être contrastées dans certaines indications à minima. Soit les granules (comme précédemment), soit la phase continue sont contrastés. De récents travaux ont testé la reconstitution et l'implantation d'un substitut osseux injectable lyophilisé (MBCP-Gel) à une solution iodée. Les propriétés rhéologiques sont améliorées mais les propriétés biologiques semblent altérées [120]. De plus les solutions iodées posent le problème des allergies à l'iode.

II.3.9. Effets taille et forme de particules

Les céramiques phosphocalciques sont des matériaux disponibles sous de nombreuses formes anatomiques (coins d'ostéotomie, inserts de cages intervertébrales) et galéniques (*poudres*, blocs, injectable/moulable/auto-durcissant). Les progrès en chirurgie mini-invasive ont favorisé le développement de matériaux injectables contenant des particules/granules de céramiques phosphocalciques.

Plusieurs études ont montré un comportement différentiel des cellules du tissu osseux face aux particules et ce quelque soit leur origine (métaux, polymères, céramiques) [72] [121] [122] [123] [124]. Le descellement des hanches, par exemple, est provoqué par l'ostéolyse de l'os dont l'origine semble provenir de la présence de microparticules issues de l'érosion de la prothèse [125]. En effet, la phagocytose des particules par les ostéoblastes entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 et la prostaglandine E2 qui inhibent la synthèse de collagène de type I et l'activation des ostéoclastes. Celle initiée par les monocytes et les macrophages libèrent d'autres cytokines comme l'IL-1 β et le TNF α qui

entraîne la différenciation des précurseurs en ostéoclastes. Globalement, la phagocytose des particules par les cellules du tissu osseux entraîne la libération de cytokines qui affectent négativement les fonctions ostéoblastiques et ostéoclastiques amenant à l'ostéolyse [126] [127]. Ces mêmes effets ont été démontrés avec le délaminage de revêtements prothétiques phosphocalciques. Il a été également démontré que la quantité de cytokines libérées était dépendante de la forme des particules. Ainsi, au contact du tissu osseux, les particules d'hydroxyapatite de forme ronde produisent moins de cytokines que les particules irrégulières peut-être plus à même de percer la membrane cytoplasmique des cellules et libérer des signaux favorisant la production de cytokines [128]. La réponse biologique du tissu osseux face au matériau va également être taille dépendant. En effet, les particules de grande taille (>80 µm) vont favoriser une attache cellulaire contrairement aux plus petites particules (<20 µm) qui vont favoriser leur phagocytose par les cellules osseuses et macrophages. L'ensemble de ces mécanismes est complexe et met en œuvre d'importants intermédiaires cellulaires et moléculaires si bien que chaque étude doit être analysé précautionneusement en fonction des travaux (*in vitro* ou *in vivo*), du type cellulaire utilisé, du modèle animal ou de la taille du défaut. Malard *et coll.* ont démontré chez le rat une repousse osseuse supérieure quand le défaut est comblé avec de petites particules de BCP (10-20 µm) contrairement à des particules plus grosses. Ici l'influence de l'effet inflammatoire, apporté par les plus petites particules de CaP sur la vitesse de repousse, semble être primordiale [72]. Le même type de mécanisme semble être obtenu dans les travaux de Gauthier *et coll* [129]. Pourtant la libération de cytokines a un effet délétère sur la formation du tissu osseux, mais dans certaines conditions, elle favorise une cascade d'évènements propice à l'ostéogénèse, de même la cicatrisation osseuse passe par une phase inflammatoire [130] [131].

II.3.10. Méthodes de mise en forme de granulés de céramiques de phosphate de calcium

La granulation a pour but de transformer des particules de poudres cristallisées ou amorphes en agrégats solides plus ou moins résistants et plus ou moins poreux appelés granulés ou grains. Selon l'application les granules doivent présenter un certain nombre de propriétés.

Nous décrivons ici les techniques permettant l'obtention de granules en phosphate de calcium céramisés. Ces granules sont utilisés dans les matériaux injectables pour le comblement et la réhabilitation osseuse. La fabrication de granules de phosphate de calcium est un processus complexe qui met en jeux 3 étapes principales :

(i) Agrégation / mise en forme

(ii) Tamisage

(iii) Frittage

L'étape d'agrégation / mise en forme est destinée à optimiser les propriétés intrinsèques des particules, la rhéologie ou encore la microstructure de surface. Le tamisage permet de resserrer ou d'élargir la granulométrie en fonction de l'application dédiée. Plusieurs techniques de tamisages existent : par aspiration, sec et enfin sous eau qui est la plus efficace dans notre cas car le phosphate de calcium est peu soluble dans l'eau et permet une bonne ségrégation des granulés. Enfin l'étape de frittage entraîne la consolidation des particules. La température de frittage va influencer la formation des joints de grains, les propriétés mécaniques et la bioactivité des granulés.

II.3.10.1. Préparations sèches, sans addition d'un agglutinant, diluant ou liquide de mouillage

(i) *Concassage / tamisage* : la poudre de phosphate de calcium est frittée sous la forme d'un bloc compact. Le bloc est ensuite broyé (broyeurs à mâchoires, à mortier ou ultra-centrifuge adaptés à la granulométrie finale). On obtient des particules de tailles et de formes irrégulières. Une étape supplémentaire d'érosion (utilisation d'une chambre de mélange de type turbulat) permet d'obtenir de diminuer ces irrégularités. Les particules obtenues sont ensuite tamisées.

(ii) *Granulation sèche* : cette méthode utilise une poudre amorphe et cohésive de type CDA (calcium deficient apatite). La poudre sous forme de « cake » est broyée sous rotation qui entraîne par cohésion/érosion la formation de granules calibrés à partir de paramètres pré-déterminés (vitesse et temps de rotation, pression d'écrasement, type de CDA). La fraction désirée est tamisée. La fraction non sélectionnée est remise dans le circuit afin d'atteindre des niveaux élevés de rendements (jusqu'à 60%).

II.3.10.2. Préparations humides par addition d'un agglutinant, diluant ou liquide de mouillage

(i) *Atomisation* : dans une chambre de séchage, un liquide est dispersé par un gaz sous pression via une buse de pulvérisation sous forme d'un nuage de fines gouttelettes. Celles-ci sont dans un deuxième temps séchées par un courant d'air chaud produit en amont de la buse. En fin dans un troisième temps, le produit séché est séparé de l'air via un cyclone et est

récupéré dans un récipient. Les caractéristiques du produit séché (taille, forme, humidité résiduelle) peuvent être modifiées en faisant varier de multiples paramètres comme la température d'entrée de l'air en amont du nuage de pulvérisation, la vitesse du flux séchant, la pression de pulvérisation du liquide au travers de la buse et la vitesse de la pompe amenant le liquide vers la buse.

(ii) *Fluidisation* : un lit de particules solides à agglomérer est disposé dans une cuve sur une plaque de diffusion. De l'air chaud et sec est au travers de cette plaque (air du bas vers le haut) et circule dans le lit de matière solide. La poudre est suspendue par l'air et se comporte comme un fluide. L'agglomération de la poudre est réalisée en pulvérisant de fines gouttes de liquide sur la poudre fluidisée. En modifiant la température et la pression de l'air de fluidisation, la pression de pulvérisation, les caractéristiques des agglomérats formés seront différentes.

(iii) *Granulation humide* : l'atomisation ainsi que la fluidisation permettent l'agglomération de poudre sous forme de particules. Afin d'augmenter la cohésion intergrain, des liants de type polymère peuvent être ajoutés. Nos granulés de phosphate de calcium produits nécessitent une cohésion importante entre les cristaux pour obtenir des propriétés mécaniques suffisantes, avec dans notre cas l'utilisation de poudres de phosphate de calcium, une étape de frittage est nécessaire.

D'autres techniques chimiques permettent d'obtenir des granulés comme les méthodes de précipitation en solution.

III. CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes

III.1. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, les céramiques en phosphate de calcium sont des matériaux complexes qui nécessitent d'être parfaitement caractérisés avant leur implantation. Chaque paramètre, comme la composition chimique (rapport HA/ β -TCP, ajout d'éléments fonctionnels) ou la structure (microstructure, taille, forme...), peut en effet entraîner des comportements et des réponses biologiques extrêmement variés pouvant s'orienter vers des événements ostéolytiques ou ostéogéniques. Des méthodes analytiques ont été mises au point pour permettre de déterminer ces caractéristiques physico-chimiques comme la diffraction des rayons X qui évalue les types de cristaux spécifiques d'une espèce chimique ou encore le potentiel zeta qui permet de mesurer la charge électrostatique de surface qui est un paramètre déterminant dans l'ostéogénèse. D'autres moyens sont disponibles additionnels ou complémentaires. Les caractérisations ne s'arrêtent pas au matériau lui-même mais aussi aux effets qu'il produit autour de lui dans un contexte cellulaire, tissulaire ou organique. Les matériaux sont souvent, dans un premier temps, testés *in vitro* selon des normes propres afin d'évaluer une réponse cellulaire simple comme sa vitalité ou l'expression et/ou la libération de protéines d'intérêt par des techniques d'observation, biochimiques ou de biologie moléculaire. La seconde étape est l'étape préclinique sur petits et gros animaux qui vont permettre d'étudier les effets du matériau sur la machinerie complexe tissulaire au niveau local et systémique. Les techniques d'histologie sont là pour décrire les événements et les types cellulaires rencontrés.

L'ensemble de ces techniques permet à la fois de connaître le matériau mais aussi d'évaluer les mécanismes qu'il engendre face aux facteurs biologiques.

III.2. Caractérisations physico-chimiques des matériaux phosphocalciques

III.2.1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est une méthode utilisée pour identifier la nature et la structure de produits cristallisés comme les céramiques phosphocalciques.

Principe : Les cristaux, constitués de réseaux tridimensionnels réguliers, peuvent diffracter les rayons X qui ont une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les dimensions du réseau cristallin. L'échantillon à analyser, sous forme poudre, est disposé dans une coupelle avec un niveau plan. Un rayonnement X, de longueur d'onde λ , est envoyé sur celui-ci qui le

réfléchit en fonction des plans réticulés du réseau cristallin de l'échantillon. Le diffractogramme obtenu apparaît comme une succession de pics spécifiques à l'organisation cristalline de l'échantillon. Dans notre cas, l'analyse par diffraction des rayons X de phosphates de calcium permet d'avoir accès à diverses informations dont : l'identification et la pureté des structures cristallines, les proportions des composés cristallins présents ou encore la détermination des paramètres de maille du composé analysé [132].

III.2.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet d'apporter des informations sur les groupements fonctionnels des apatites synthétiques : (i) identification du composé étudié ; (ii) présence de groupements fonctionnels (CO_3^{2-} , HPO_4^{2-}) ; (iii) effets des substitutions sur les vibrations des groupements PO_4 ou OH.

Les groupements PO_4^{3-} présentent 4 modes de vibrations : ν_1 entre 950 et 1000 cm^{-1} , ν_2 à 470 cm^{-1} , ν_3 entre 1000-1500 cm^{-1} et ν_4 entre 500 et 650 cm^{-1} . Le mode de vibration du OH apatitique de l'hydroxyapatite correspond à 630 cm^{-1} .

Les spectres d'absorption infrarouge des phosphates de calcium biphasés BCP sont une contribution des bandes d'absorption de l'hydroxyapatite (groupements PO_4^{3-} et OH^-) et du phosphate tricalcique β (groupements PO_4^{3-})

Principe : Le composé à analyser est soumis à une radiation (comprise entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1}). Lorsque la fréquence de cette radiation incidente est égale à la fréquence de résonance des molécules constituant l'échantillon, il y a absorption de l'énergie caractéristique des molécules. Les échantillons (environ 1%) sont enfermés dans une matrice de bromure de potassium (KBr) sous forme de pastille avant d'être soumis aux radiations IR.

III.2.3. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

L'analyse MEB permet l'observation générale et la microstructure (taille des cristaux, microporosité) des matériaux de céramiques phosphocalciques. Le MEB permet également d'apprécier la morphologie des cellules osseuses (ostéobastes, ostéoclastes ou cellules souches mésenchymateuses) au contact du matériau. En mode électrons rétrodiffusés, les différences de densité des matériaux peuvent être observées qui permet notamment de mesurer le taux de repousse osseuse au contact du biomatériau.

Principe : Le fonctionnement du microscope électronique à balayage est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de

ces électrons avec l'échantillon. Le faisceau d'électron est focalisé sur la surface de l'échantillon sous forme d'une tâche (spot), déplacée ligne par ligne de façon à balayer une surface rectangulaire. Ces électrons qui irradient la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau et affectent un volume appelé « poire d'interaction » qui dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon et de l'énergie des électrons incidents. Dans ce volume d'interaction, les électrons du faisceau vont perdre leur énergie par collisions multiples avec des atomes du matériau générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires comme les réémissions d'électrons et de photons ou encore l'absorption d'électrons qui rendent possibles à la fois l'observation et l'analyse d'un objet choisi.

Ce procédé permet l'observation de structure de plusieurs centaines de nanomètres et notamment la morphologie générales de matériaux telles que les céramiques de phosphate de calcium.

III.2.4. Spectroscopie en dispersion d'énergie des rayons X (EDXS)

Principe : Lorsqu'un électron d'énergie suffisante vient frapper un atome, il excite un électron qui est expulsé. Un électron de couche externe vient alors prendre la place vacante et un photon X caractéristique de l'élément est émis. Le spectre des rayons X émis par l'objet contient donc des pics aux énergies caractéristiques des éléments présents (La spectroscopie EDX ne permet pas la quantification d'éléments légers : $Z < 11$). Couplée à la microscopie électronique à balayage, cette analyse permet une détection qualitative et semi quantitative des éléments présents dans l'échantillon.

III.2.5. Analyse d'image

L'analyse d'image est, dans notre cas, un procédé qui permet de quantifier le taux de repousse osseuse après implantation d'un substitut de quantification [57] [133] [134]. Cette méthode, couplée à la microscopie électronique à balayage en mode rétrodiffusé, permet l'acquisition d'image en niveaux de gris caractéristiques de la masse atomique des éléments. Ainsi la céramique apparaîtra en blanc, le tissu osseux en gris et les tissus non minéralisés en noir. Cette ségrégation rend possible l'analyse d'image et la quantification des différents éléments analysés, principalement le taux de repousse osseuse et la résorption du matériau.

III.2.6. *Microscopie Electronique à Transmission (MET)*

La morphologie des nano-structures comme la précipitation des cristaux d'apatite biologique, les interfaces matériau/cellule osseuse ou tissu tiennent une place importante dans la compréhension des phénomènes de bioactivité/ostéogénèse (Figure 5). La petite taille de ces éléments les rend difficile à observer et nécessite l'utilisation d'équipement tel que le MET qui permet l'accès à des structures de l'ordre de 10^{-10} m.

Préparation des échantillons : Les échantillons doivent être suffisamment fins (environ 70 nm) pour laisser passer les électrons. Pour pouvoir atteindre ce niveau d'épaisseur, les échantillons non décalcifiés sont inclus en résine dure (50% méthylméthacrylate + 50% butylméthacrylate) et ensuite coupés à l'aide d'instruments d'ultramicrotomie (ultramicrotome et couteau diamant).

Principe : La microscopie électronique à transmission met en œuvre un faisceau large d'électrons traversant un échantillon très mince. La longueur d'onde associée au faisceau, donne le pouvoir de résolution maximum accessible qui est de l'ordre atomique (10^{-10} m). Les électrons du faisceau sont guidés à l'aide de lentilles magnétiques. La colonne du microscope est placée sous un vide poussé de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} Pascal. Les lentilles du système condenseur servent à éclairer l'échantillon avec un faisceau parallèle. Celles de l'objectif permettent d'obtenir de l'objet une figure et de grandir une centaine de fois la taille de l'objet observé. Elles permettent également d'obtenir de l'objet une figure de diffraction dans le plan focal et une image dans le plan image. Les lentilles de projection agrandissent encore l'image et assurent sa visualisation sur un écran fluorescent.

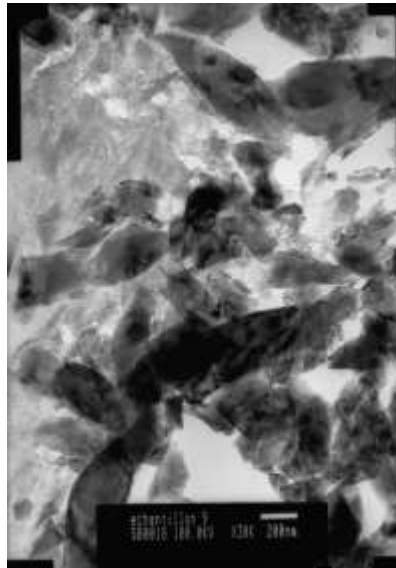


Figure 5 : Cliché en transmission électronique d'un phosphate de calcium (BCP 6040) implanté dans l'épiphyse fémorale distale d'un rat après 6 semaines. On peut parfaitement voir la re-précipitation d'apatite biologique sur les cristaux de BCP.

III.2.7. Charge de surface et potentiel zeta

Un des événements précoces de l'intégration d'un biomatériau concerne l'adsorption en surface des protéines issues des fluides biologiques [92] [94] [93]. Le potentiel zeta est un des paramètres influençant ce phénomène.

Le potentiel zeta correspond à la charge de surface d'une particule solide en solution. Les principaux facteurs qui affectent le potentiel zeta d'un solide sont : le pH, la force ionique et les solutés de la solution. Les charges de surface des phosphates de calcium vont être fortement influencées par les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} qui vont se former en solution. Les charges de surface vont notamment influencer l'adsorption des protéines qui joue un rôle important dans l'ostéogénèse des céramiques phosphocalciques.

Principe : Lorsqu'il existe un mouvement relatif du solide et du liquide (par exemple sous l'effet d'un champ électrique), un cisaillement se produit pratiquement au niveau du diamètre hydrodynamique des particules de solide : les ions fortement liés à la surface du solide restent solidaires de cette surface, alors que les ions plus faiblement liés s'en séparent progressivement et migrent avec la solution. Le potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement est appelé potentiel zêta (ζ). Du fait de la décroissance du potentiel au sein de la double couche, il est toujours inférieur au potentiel de surface (ψ_0). Le potentiel zêta est proportionnel à une densité de charge, exprimée en C/m^2 .

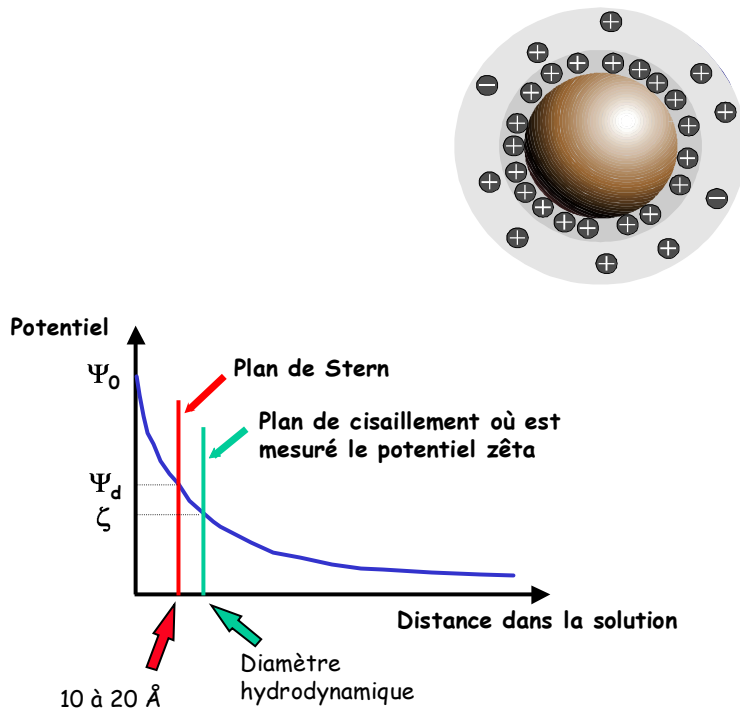


Figure 6 : Modèle et théorie du potentiel zeta

III.3. Caractérisations biologiques *in vitro* des matériaux phosphocalciques

Ces tests ont pour objectif d'évaluer les réponses biologiques *in vitro* de cellules osseuses au contact de différents substrats phosphocalciques parfaitement caractérisées et ainsi d'optimiser les paramètres physico-chimiques pour une meilleure ostéo-intégration de ces derniers. Les cellules sont mises en contact des biomatériaux étudiés (contact direct ou non) selon un protocole préalablement établi (matériau, type cellulaire, densité cellulaire, milieu de culture, contrôles, temps de culture...etc). Elles sont ensuite soumises à différents tests qui vont permettre de mesurer les variables cellulaires comme la viabilité (activité enzymatique MTS, comptage, morphologie cellulaire) ou le niveau de différenciation (alkaline phosphatase spécifiques des ostéoblastes, marqueurs immunologiques, Q-PCR)

III.3.1. Cytotoxicité, Norme ISO 10993-5 :

Les tests de cytotoxicité *in vitro* pour dispositifs médicaux sont décrits par la norme ISO 10993-5. Ces méthodes spécifient l'incubation d'une culture cellulaire en contact avec un « extrait » du matériau à tester ou bien en contact direct si le matériau le permet (par exemple s'il ne se dissout pas dans le milieu de culture).

III.3.1.1. Conditions de culture

La lignée d'ostéoblaste de souris MC3T3-E1 a été utilisée dans notre étude [135]. Il s'agit d'une lignée dérivée de fibroblastes de la calvaria d'embryon de souris C57BL/6. Les cellules sontensemencées à raison de 10 000 cellules/cm². L'étude est réalisée avec un témoin négatif de la cytotoxicité à savoir le polystyrène des boîtes de culture traité pour utilisation en biologie cellulaire et comme témoin positif de cytotoxicité l'actinomycine D à une concentration de 5µg/ml.

III.3.1.2. Préparation de l'extrait

Les conditions d'extraction doivent être comparables aux conditions rencontrées en milieu biologique afin de pouvoir, autant que possible, définir le réel potentiel cytotoxique du dispositif médical testé. Cependant les conditions d'extraction et les caractéristiques du matériau sont très variables et peuvent influencer la libération des substances cytotoxiques comme la surface d'échange, le volume d'extraction, le pH, la solubilité, l'agitation, la température d'extraction. Dans nos conditions, l'extraction a été réalisée à 37°C à 5% de CO₂ pendant 72h sous agitation contrôlée et à une concentration de 0,2 g de matériau par millilitre de milieu d'extraction. Nous avons également réalisé deux dilutions aux 1/10^{ème} et 1/100^{ème} qui permettent de mesurer la dose cytotoxique réelle. Les cellules sont mises en culture jusqu'à confluence puis le milieu est retiré et remplacé par l'extrait pur et ses dilutions pendant 24, 48 et 72h.

III.3.1.3. Contact direct

Quand cela est possible, le matériau est déposé au fond des puits de culture et les cellulesensemencées à sa surface. Généralement le matériau est présenté sous forme d'un disque d'un millimètre d'épaisseur et de diamètre équivalent à celui du puits de culture pour une meilleure reproductibilité. Dans le cas des céramiques phosphocalciques, il est préférable d'effectuer une préincubation de 24h dans le milieu de culture afin de diminuer la saturation en ions dans le milieu (acidification du milieu).

III.3.1.4. Méthodes de détermination de la cytotoxicité

Il est possible d'évaluer la cytotoxicité par deux méthodes : qualitative ou quantitative. *L'évaluation qualitative* repose sur l'observation des cellules comme les changements

morphologiques, la vacuolisation ou la lyse membranaire. Brièvement, après la culture, les cellules en contact du biomatériau sont fixées (glutaraldéhyde), déshydratées par des bains successifs de concentrations croissantes d'éthanol et de trichlorotrifluoroéthane. Enfin l'ensemble est métallisé à l'or/palladium pour une observation par microscopie électronique à balayage.

Dans le cas d'une *évaluation quantitative*, les méthodes utilisées sont les mesures de mort cellulaire, de prolifération, du nombre de cellules, du relargage d'enzymes ou protéines. Nous avons choisi un test qui permet d'évaluer la vitalité cellulaire : le test MTS pour mitosis tetrazolium salt. Ce test colorimétrique mesure la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de tétrazolium MTS en formazan [136]. Le produit coloré formé est proportionnel à l'activité déshydrogénase des mitochondries. La mesure de l'absorbance à 490nm permet de quantifier cette activité et donc par extrapolation la viabilité cellulaire. Après la culture, les cellules sont lavées avec du milieu complet et incubées 25 minutes à 37°C en présence de 100 µl de réactif MTS dans 500µl de milieu complet. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité MTS par rapport aux conditions contrôles [137].

III.3.2. *Différenciation cellulaire*

Il est important de connaître les conditions de différenciation d'un type cellulaire afin de produire des matériaux adaptés à leur environnement notamment l'environnement osseux. Dans le cas des céramiques phosphocalciques, les études menées montrent leur pouvoir ostéogénique [91] [138]. Les techniques de mesure de différenciation sont nombreuses, comme les techniques immunologiques ou l'amplification de matériels génétiques spécifiques des cellules osseuses (ELISA, Q-PCR). Dans notre cas nous avons utilisé une méthode simple basée sur la mesure de l'activité enzymatique d'une protéine spécifique des ostéoblastes : la phosphatase alcaline ou PAL. Pour vérifier et mesurer l'expression de ce marqueur de la au contact de nos différents substrats phosphocalciques, nous avons étudié leurs activités PAL, après 14 jours de culture pour les lignées ostéoblastiques (temps nécessaire à l'expression de ce marqueur).

Il s'agit d'un test colorimétrique qui mesure l'activité phosphatase alcaline des ostéoblastes en culture [139] [135]. Cette activité apparaît lors de la différenciation des ostéoblastes et transforme le paranitrophénylphosphate ou pnpp (incolore) en un composé jaune. L'absorbance mesurée est proportionnelle à l'activité phosphatase alcaline des cellules. A la fin des cultures, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec 200 µL de Nonidet P-40

ou NP-40 (0,2 %). Les disques de matériau sont grattées et le NP-40 transféré dans un tube en verre dans la glace. Après sonication pendant 30 secondes, les cellules sont centrifugées à 3 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. 100 µL du surnageant est ajouté à 900 µL de réactif préalablement chauffé à 37 °C. La solution est incubée au maximum 1h au bain-marie à 37°C. La réaction est stoppée avec 400 µL de NaOH 1 M. L'absorbance est mesurée à 495 nm. Les résultats sont exprimés en nmol de Pi/min/mg de protéines.

III.3.3. Etude de l'effet bactéricide et/ou bactériostatique de céramiques phosphocalciques

Durant la phase de comblement du défaut osseux par des céramiques phosphocalciques, le risque infectieux persiste et nécessite une antibiothérapie [140, 141]. Le traitement systémique par antibiotiques ne permet pas d'atteindre les concentrations suffisantes pour inhiber la prolifération bactérienne et particulièrement dans le tissu osseux où leur diffusion est lente. Les chercheurs ont développé un système associant céramique phosphocalcique et antibiotique qui permet à la fois le comblement du défaut et le traitement de l'infection. Cependant la fabrication des céramiques implique une étape de traitement thermique (> 1000°C). Cette étape est nécessaire mais ne permet pas le mélange préalable de molécules thermosensibles. Pour contourner ce problème, plusieurs techniques d'association d'agent thérapeutiques aux céramiques ont été développées avec plus ou moins de réussite : revêtements antibiotiques, cavité renfermant l'antibiotique ou encore la compaction dynamique [142]. Une alternative à ces solutions est proposée avec le développement de céramiques phosphocalciques dites « oxygénées » ou « peroxydées ». Le peroxyde d'hydrogène est un puissant oxydant qui agit indifféremment sur toute matière organique, végétale ou animale. Son large spectre d'activité lui confère des propriétés notamment antibactériennes. De plus le peroxyde d'hydrogène n'est pas considéré comme agent pharmaceutique.

Principe : La souche bactérienne choisie (E. Coli) est mise en culture dans un substrat nutritif liquide puis ensemencée sur un substrat solide nutritif (gel d'agarose complété) formant un tapis bactérien. La densité bactérienne est mesurée. Les matériaux testés sont ensuite déposés en contact direct du tapis bactérien avec comme témoins négatifs de la prolifération bactérienne, un antibiotique et ses dilutions. Après 24h, l'activité bactéricide du matériau est comparée à celle de l'antibiotique. L'activité bactéricide provoque une lyse bactérienne qui

peut-être observée par apparition de plages claires autour de l'antibiotique et/ou du matériau. L'ampleur des plages claires est proportionnelle à l'activité bactéricide.

III.4. Caractérisations biologiques *in vivo* des matériaux après implantation : histologie

III.4.1. Modèles animaux

Les études précliniques chez l'animal sont indispensables pour tester les performances d'un matériau : mesure de la repousse osseuse, dégradation et résorption, cytotoxicité locale ou systémique. Tous les animaux implantés, sont traités dans des procédures éthiques selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) dans un environnement contrôlé. Différents modèles animaux sont choisis. Les plus petits, rats et lapins, vont préférentiellement servir aux études pilotes même si le lapin convient à des études de plus grande ampleur. Leur métabolisme rapide permet des temps d'implantation court. Chez les plus gros mammifères, chien ou chèvre, le métabolisme est plus lent et se rapproche d'avantage de celui d'un être humain. Le modèle d'implantation choisi correspond le plus souvent à la création d'un défaut de taille critique [143] [144] dans l'épiphyse fémorale distale en site trabéculaire qui est par la suite comblé par le matériau de substitution osseuse. Le matériau peut également être implanté en site ectopique pour mesurer un éventuel rejet ou un potentiel ostéo-inducteur [138]. Les matériaux sont laissés en place pour une à plusieurs semaines selon la cinétique désirée avant euthanasie et prélèvement.

III.4.2. Préparation des tissus

III.4.2.1. Fixation / Déshydratation, Imprégnation / Inclusion

Après explantation, les tissus sont immédiatement taillés et fixés dans une solution tamponnée de formol neutre 1/9 (le formaldéhyde présente la caractéristique de former des liaisons covalentes entre les différentes molécules biologiques, les stabilisant ainsi et inhibant les activités enzymatiques) pendant plusieurs jours (dépendant de la taille du prélèvement) avec changement de bain tous les 2 jours. Après fixation les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (70, 80, 95, 100, 100%) avec également un changement de bain tous les 2 jours au minimum. La technique de coupe et d'analyse que nous utilisons ne nécessite pas de décalcification préalable.

Après fixation et déshydratation, les tissus sont imprégnés dans une solution de polyméthyl méthacrylate déstabilisée (par lavages successifs dans une solution de soude à 5%) contenant un plastifiant le polyéthylène glycol (PEG). Toujours en fonction de la taille l'imprégnation peut prendre une dizaine de jours. Les échantillons sont ensuite préparés pour inclusion dans un moule contenant la résine et un initiateur. La polymérisation a lieu à 4°C.

Une fois les échantillons inclus, ils sont taillés et préparés pour la coupe au niveau de la zone d'intérêt (plan de coupe sagittal). Soit des coupes « épaisses » d'environ 70 µm qui permettent l'observation photonique en lumière polarisée des fibres organisées de collagène, soit des coupes « fines » de 6 à 10 µm pour des colorations biochimiques spécifiques. L'autre partie du bloc de résine contenant la zone d'intérêt est polie et métallisé pour observation en microscopie électronique (se rapporter au paragraphe III.2.3 consacré au MEB).

III.4.3. Les différents techniques histologiques dans l'analyse d'un tissu osseux

III.4.3.1. Lumière polarisée

La matrice organique du tissu osseux est majoritairement composée de collagène de type I. La principale caractéristique de ce collagène est la présence d'une triple hélice résultant de l'association de 3 chaînes peptidiques. Cette propriété donne au collagène un pouvoir réfringent lorsqu'il est observé en microscopie optique polarisée. Lors de l'analyse d'explants osseux contenant un matériau ostéogénique, la simple observation d'éléments réfringents orientés, dans ou au contact du biomatériau, permet d'indiquer la forte probabilité de la présence de collagène de type I et donc d'un tissu osseux. Néanmoins cette observation ne permet pas de déterminer si le tissu est minéralisé ou non et nécessite des analyses complémentaires. Cet examen est réalisé sur des coupes d'environ 90 µm.

III.4.3.2. Pentachrome de MOVAT

Cette coloration à cinq couleurs permet de mettre en évidence l'absence ou la présence de différents tissus tels que les fibres de collagène, les fibres élastiques, le cartilage calcifié, l'os minéralisé ou bien des cellules avec leur noyau en noir et le cytoplasme en rouge. Globalement, une coupe de tissu osseux contenant un matériau phosphocalcique et implanté en site osseux sera composée des éléments suivants (Figure 7) :

- bleu/blanc : phosphate de calcium
- rouge vif : ostéoïde

- vert/jaune : tissu minéralisé
- rose : moëlle osseuse

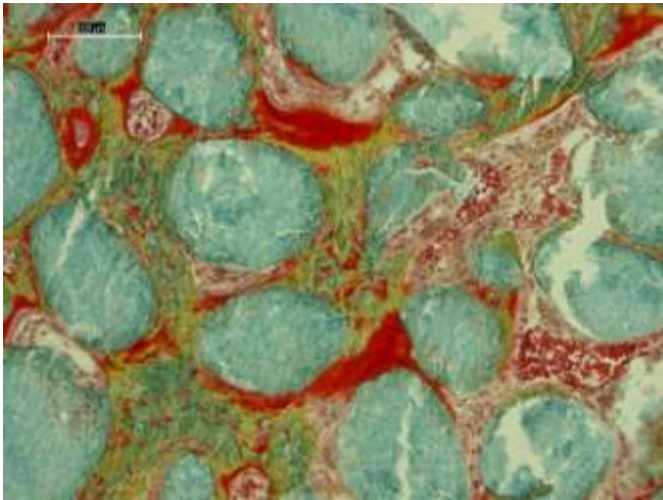


Figure 7 : Granules ronds de BCP 6040 implantés 3 semaines dans un fémur de rat. Coloration au pentachrome de Movat. Bleu : matériau CaP, rouge : ostéoïde, vert/jaune : tissu osseux minéralisé et rose/rouge : moëlle osseuse.

III.4.3.3. Hématoxyline Eosine Safran (HES)

Cette coloration permet la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. La coloration à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) est une coloration de routine dite «topographique». C'est une coloration trichromique : c'est-à-dire une coloration nucléaire bleue résultant de l'action de l'hémalun et une coloration orangé-rouge provenant de l'action de l'éosine. Quant au safran, c'est un colorant naturel anionique capable de se fixer sur des structures acidophiles lâches telles que les fibres de collagène. Après fixation la couleur safranée se diffuse dans tout le tissu grâce à un phénomène d'absorption. L'HES permet l'identification des différents types cellulaires et notamment ceux intervenant dans les phénomènes de rejet ou d'inflammation comme les monocytes ou les macrophages

III.4.3.4. Phosphatase acide tartrate résistante (TRAP)

La TRAP est une enzyme reconnue comme l'un des marqueurs ostéoclastiques [145] [146] contenu à l'intérieur des ostéoclastes. Cette dernière traduit l'activité de résorption. Ainsi la concentration en phosphatase acide tartrate résistante est élevée chez les patients atteints de

pathologies osseuses comme la maladie de Paget ou l'ostéoporose. L'activité enzymatique est mise en évidence par une coloration biochimique de couleur rouge/orangée. On retrouve souvent cette coloration sur les bords des tissus osseux en cours de remodelage et également sur les matériaux phosphocalciques en cours de dégradation.

III.4.4. Histomorphométrie

L'histomorphométrie consiste à la mesure de paramètres morphologiques tissulaires. Dans le cas du tissu osseux différentes structures sont mesurables :

- le volume trabéculaire osseux (VTO ou BV/TV) : pourcentage de tissu osseux dans un volume donné. Schématiquement, il représente le rapport pleins/creux dans l'os.
- l'épaisseur ostéoïde (EO) : épaisseur moyenne des liserés ostéoïdes (matrice collagénique servant de support à la calcification, synthétisée par les ostéoblastes).
- les surfaces ostéoblastiques (SOB) : pourcentage des surfaces trabéculaires (ou travées d'os spongieux) présentant des ostéoblastes morphologiquement actifs.
- les surfaces ostéoclastiques (SOC) : pourcentage de surfaces trabéculaires présentant des lacunes de résorption occupées par un ou plusieurs ostéoclastes.
- la vitesse de minéralisation (VM) : calculée en divisant la distance moyenne entre deux marquages fluorescents (résultant de l'accumulation de tétracycline au niveau du front de minéralisation) par l'intervalle de temps séparant ces deux marquages.

Ces mesures sont rendues possibles par méthodes invasives comme le double marquage fluorescent ou l'analyse d'image sur coupes histologiques ou par des techniques non invasives telles que la tomодensitométrie.

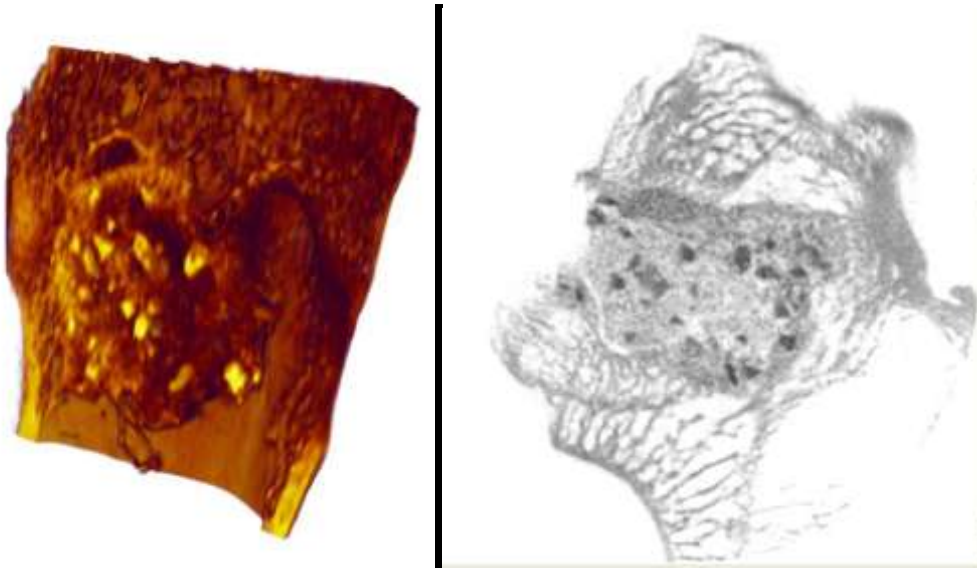


Figure 8 : Reconstruction 3D et 2D d'une épiphyse fémorale de lapin implantée 6 semaines avec un matériau phosphocalcique.

III.5. Conclusion

Les techniques physico-chimiques et biologiques permettant la caractérisation des matériaux en phosphate de calcium avant implantation et dans un environnement sont nombreuses. Celles brièvement présentées dans ce chapitre « caractérisations » ne représentent pas une liste exhaustive des techniques existantes mais permettent de juger des principaux critères de performance comme les paramètres :

- intrinsèques au matériau : composition chimique, macro-micro et nano-structures, propriétés mécaniques ;
- comportement des tissus au contact du matériau : morphologie, biochimie, histologie, paramètres histomorphométriques.

IV. CHAPITRE 3 : Résultats et Discussion

Actuellement, les céramiques de phosphate de calcium sont disponibles sous plusieurs formes (blocs, particules, revêtements...). Avec le développement des chirurgies de réparation osseuse à minima (Minimal Invasive Surgery, MIS), s'est développé le « granule concept » basé sur la combinaison de granules de céramiques phosphocalciques à des polymères ou des ciments phosphocalciques [1] avec actuellement le développement et/ou la commercialisation de plusieurs matériaux injectables [33] [64] [65] [147]. Dans ces matériaux, l'ostéogénicité est apportée par la bioactivité des granules de céramiques phosphocalciques. Un autre élément important des matériaux pour la chirurgie à minima de réparation osseuse concerne l'injectabilité. Celle-ci va déterminer l'aisance d'utilisation et de mise en place du matériau dans le défaut osseux. Elle peut-être modifiée en changeant les propriétés de la phase particulaire ou celles de la phase continue. La rhéologie de la phase continue peut-être adaptée en ajoutant différents agents liants comme les polymères et/ou en changeant leur concentration. L'écoulement de la phase contenant les particules est amélioré en diminuant leur taille, le resserrage de la distribution des tailles et leur morphologie plutôt arrondie [148]. Et enfin, l'optimisation de la radiopacité de ces matériaux peut se révéler nécessaire dans certaines indications de chirurgie osseuse du rachis.

IV.1. Elaboration et caractérisation de granules de céramique microporeux

Dans un premier temps nous avons évalué plusieurs méthodes permettant d'obtenir des granules ronds de petites tailles (<200 µm). Dans un second temps les granules obtenus ont été caractérisés par différentes méthodes analytiques.

IV.1.1. Essais de mise en forme de granules ronds de céramique de phosphate de calcium

Deux techniques de mise en forme des substituts osseux phosphocalciques ont été testées : (i) le séchage par pulvérisation (atomisation) et (ii) le lit fluidisé. Nous avons effectués nos essais à partir de poudres de CDA (Biomatlante).

IV.1.1.1. L'atomisation

L'atomisation (ou séchage par pulvérisation) est une méthode de chauffage qui a pour objet la transformation d'un produit liquide (solution ou suspension) ou pâteux en un composé particulaire solide et sec par pulvérisation du liquide dans un milieu constitué d'air chaud. Le procédé peut-être décomposé en plusieurs étapes : (i) la pulvérisation du liquide sous forme de fines gouttelettes, (ii) le contact entre le spray et l'air chaud, (iii) l'évaporation du solvant, et enfin (iv) la récupération des particules sèches. La suspension ou barbotine (composé de la CDA et d'un solvant) est amenée jusqu'à la buse par pompage où, mélangée à de l'air sous pression elle est pulvérisée en de très fines gouttelettes dans la colonne de séchage (du haut vers le bas dans notre cas). De l'air chaud entre dans la colonne de séchage dans le même sens que le liquide pulvérisé (système co-courant) et permet l'évaporation immédiate du solvant contenant les particules formant des agrégats de la taille et de la forme des gouttelettes les contenant. La récupération des particules sèches s'effectue dans la partie cyclone qui sépare le produit solide du flux d'air.

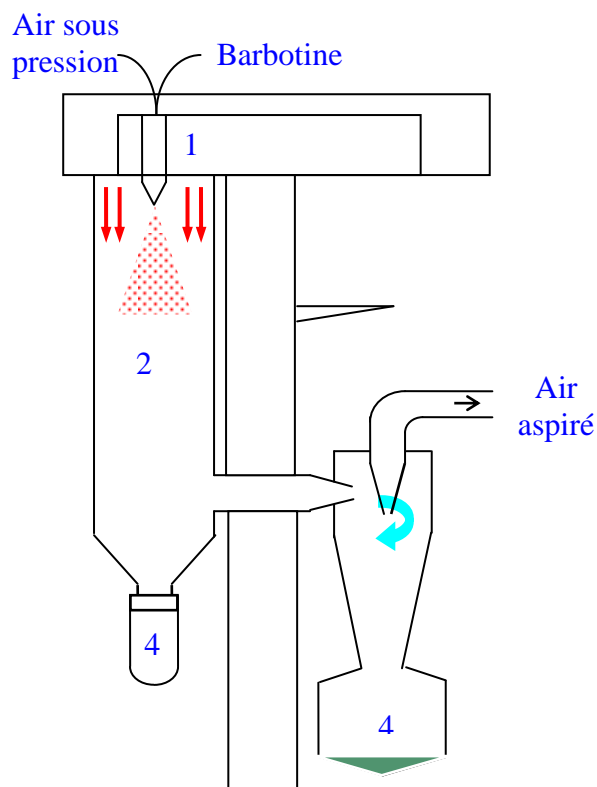


Figure 9 : Schéma d'un « spray drier » du type Buchi B290.

Principe de fonctionnement d'un atomiseur à flux co-courant :

- 1- Buse de pulvérisation
- 2- Colonne de séchage
- 3- Cyclone
- 4- Réceptacle du produit sec

Plusieurs variables vont influencer la taille, le rendement et le taux d'humidité résiduelle des particules [149]. Ces variables sont la vitesse de circulation de l'air chaud dans la chambre de séchage, la température d'entrée (en haut de la colonne), la pression de pulvérisation (amenée par un gaz sous pression), le débit de pompe (correspondant à l'alimentation de la buse en suspension) et le diamètre de sortie de buse (ici ce paramètre est fixe est égal à 0,7 mm). Le tableau 7 résume les variables liées au fonctionnement d'un atomiseur et leur impact sur les propriétés des granules. La technique d'atomisation permet d'atteindre des tailles de granules comprises entre 20 et 250 μm . Notre domaine d'application utilise le plus souvent des granules de 40 à 200 μm et parfois plus. Le tableau nous permet de comprendre que la pression de pulvérisation et la concentration de la CDA dans la barbotine sont les 2 principaux paramètres qui vont fortement influencer la taille des particules [150].

















	ASPIRATION	TEMPERATURE D'ENTREE	PRESSION DE PULVERISATION	DEBIT DE POMPE	[C]
					
TAILLE DES PARTICULES					
RENDEMENT					
TAUX D'HUMIDITE FINALE DS LE PRODUIT					

Tableau 7 : Impact des paramètres d'atomisation sur les propriétés des granules formés.

Dans une première étude pilote, nous avons fait varier ces 2 paramètres afin d'atteindre des particules de phosphate de calcium les plus larges possibles. Différentes barbotines ont été préparées contenant de la CDA mise en suspension dans de l'eau déionisée et maintenues sous agitation magnétique afin de garantir l'homogénéité de la suspension. Dans cette étude, nous avons augmenté les concentrations en CDA (10, 20 et 30% en masse) et même temps diminué l'énergie de pulvérisation (350, 475 et 600 l/h). Les constantes utilisées sont les suivantes : température d'entrée, 200°C ; vitesse de circulation de l'air chaud, 100% (35 m³/h) et débit de pompe, 70% (100 ml/h). Après séchage, les particules sont récupérées et métallisées pour analyse MEB. Quelque soit les conditions d'atomisation, l'observation MEB montre la formation de granules de 10 à 20 µm sans évolution de taille remarquable d'une condition à une autre.

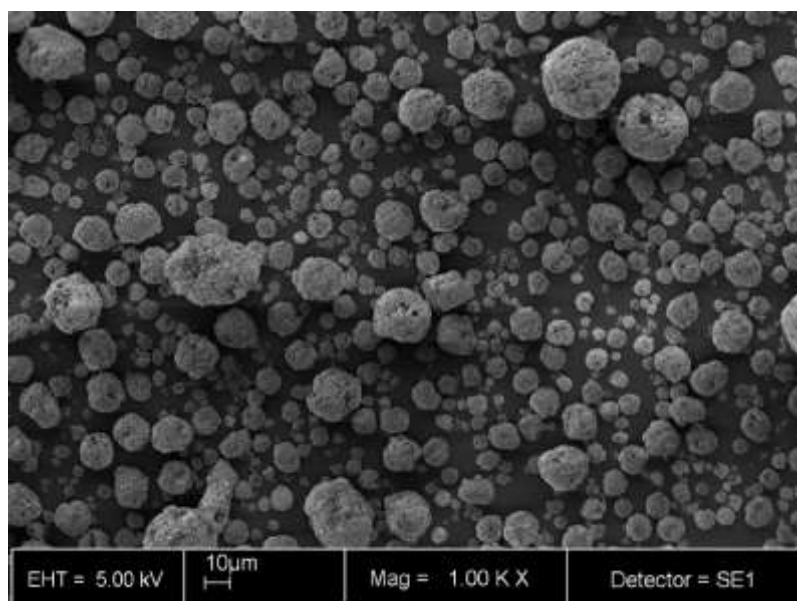


Figure 10 : Granules ronds de CDA obtenus par atomisation.

Afin d'améliorer la cohésion des particules pendant le séchage et ainsi augmenter la taille des grains, des polymères (HPMC ou gomme de xanthane) ont été rajoutés aux différentes formulations à 0,5; 1 ou 2% en masse dans le solvant. Nous avons rencontré des difficultés dans la mise en œuvre de ces nouvelles conditions par obstruction de la buse par séchage précoce du polymère empêchant la pulvérisation de la barbotine et ce même à de basses concentrations de polymère (0,5%). Les principaux problèmes rencontrés sont principalement dus à la configuration de notre appareil le Buchi B290 qui est un appareil d'expérimentation : (i) l'obstruction intempestive de la buse, (ii) la déformation du cône de pulvérisation, (iii) un mauvais rendement causé par une accumulation de produit sur la paroi de la chambre de séchage. Les premiers résultats nous ont néanmoins montrés qu'il était possible de produire des granules ovoïdaux mais de petite taille, compris entre 2 et 30 μm (Figure 10) [151].

La production de granules ronds et plus larges que ceux obtenus et avec un rendement important sont possibles et doivent passer par l'utilisation d'un appareil composé de buses plus larges ou rotatives afin d'éviter la formation de bouchons à hautes concentration en CDA ou en polymère. De plus une chambre de séchage plus longue et plus large permettrait aux granules d'effectuer un trajet plus long favorisant un meilleur séchage évitant une accumulation de matière sur les parois de l'appareil.

En parallèle du séchage par atomisation, une seconde méthode a été testée : la granulation par turbulence et fluidisation.

IV.1.1.2. Lit fluidisé

Le principe du granulateur par turbulence et fluidisation consiste à transformer en un granulé uniforme des produits pulvérulents ou granuleux. A cette fin, un liquide adéquat est finement pulvérisé au moyen d'une pompe péristaltique (8) et d'une buse (9) sur le produit en turbulence sur une plaque poreuse laissant passer l'air, entraînant la formation d'un agglomérat de particules. L'air nécessaire à l'opération est aspiré au moyen d'un ventilateur (1), puis purifié par le filtre à particules grossières (2) et enfin porté à la température voulue dans la batterie de chauffe (3). L'air traverse alors de bas en haut la matière contenue dans la cuve de produit (4) et en absorbe rapidement l'humidité après l'opération d'agglomération. Le filtre (5) retient les poussières entraînées par le courant d'air. L'air sortant s'échappe vers l'extérieur par les tubulures (6) et le tuyau (7).

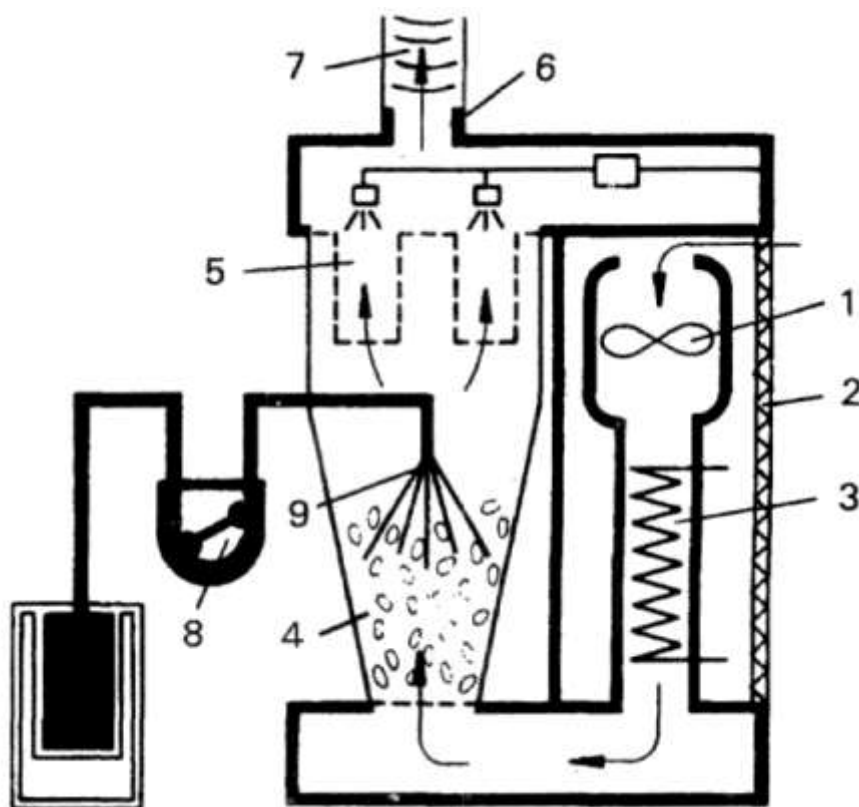


Figure 11 : Schéma de fonctionnement d'un granulateur par turbulence et lit fluidisé.

A partir des mêmes formulations de suspensions de CDA utilisées pour la granulation par atomisation nous nous sommes très rapidement rendu compte que la méthode de granulation n'était pas adaptée à nos produits. En effet, la granulation par lit fluidisé nécessite la présence d'un « noyau » dans la chambre de fluidisation qui va permettre d'amorcer la formation

d'agglomérats. De plus, la poudre de CDA trop fine ne permet pas d'avoir un lit fluidisé homogène permettant la formation d'agrégats.

Dans les conditions décrites, méthodes et configuration des appareils, les techniques d'atomisation et de fluidisation ne nous ont pas permis d'obtenir, du moins dans les rendements et tailles désirées, des granules ronds de céramiques phosphocalciques.

Une troisième méthode mise au point par la société Biomatlante et basée sur les propriétés de cohésion de la CDA nous a permis d'obtenir des granules de céramiques phosphocalciques de morphologie arrondie. (Procédé non communicable, spécifique à la société Biomatlante).

IV.1.2. Caractérisations physico-chimiques de granules ronds en céramique de phosphate de calcium

La méthode de granulation interne à Biomatlante nous a permis d'obtenir des granules phosphocalciques ronds de taille comprise entre 40-80 µm ou 80-200 µm. En fin d'élaboration, les granules d'abord sous forme de CDA sont frittés pour se décomposer en BCP 6040 ou BCP 2080. Ces granules sont caractérisés par différentes méthodes analytiques.

(i) La diffraction des rayons X nous permet d'identifier la nature et la structure des granules de céramiques phosphocalciques obtenus. Les céramiques de phosphate de calcium biphasé (BCP) sont composés des phases hydroxyapatite HA et phosphate tricalcique β (β-TCP). Le pic de plus grande intensité (pic 100) de la phase HA est diffracté à l'angle $2\theta=31,8^\circ$ et celui du β-TCP à $2\theta=31,1^\circ$ (Figure 12). En déterminant les surfaces de ces 2 pics, on peut précisément mesurer la fraction massique de chaque phase présente :

$$\% \text{ HA (ou } \beta\text{-TCP)} = \frac{\text{surface pic}_{100} \text{ HA (ou } \beta\text{-TCP)}}{\text{surface pic}_{100} \text{ HA} + \text{surface pic}_{100} \beta\text{-TCP}}$$

Nous avons ainsi obtenus les diffractogrammes de granules ronds composés de BCP. Les mesures des aires des pics 100 de HA et de β-TCP nous ont permis de caractériser 2 types de BCP avec des ratios HA/β-TCP de 60/40 et l'autre de 20/80 (Figure 12).

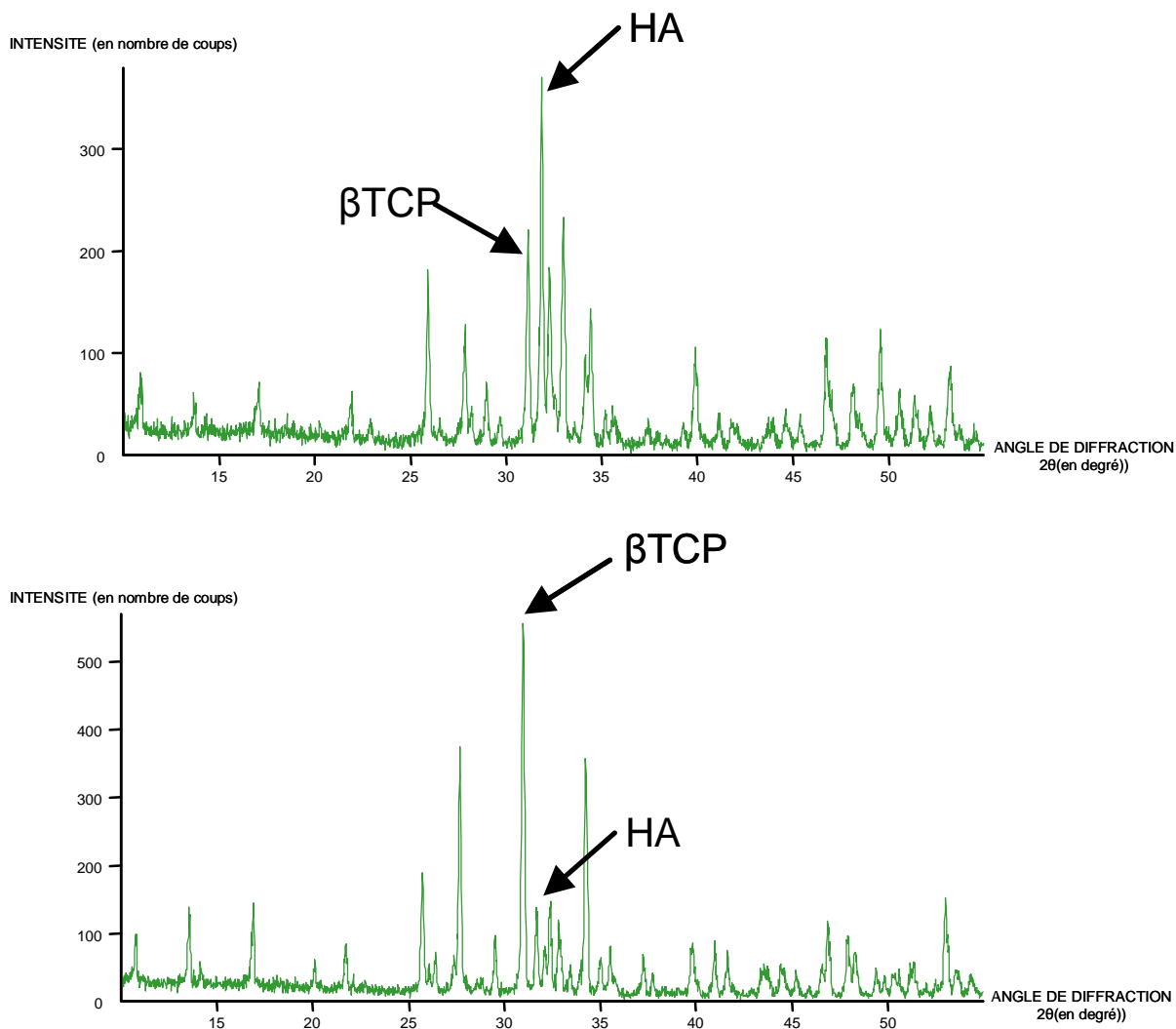


Figure 12 : Diffractogrammes de céramiques phosphocalciques biphasées l’une avec un rapport HA/β-TCP de 60/40 (en haut) et l’autre de 20/80 (en bas).

(ii) La spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (irtf) des granules nous confirme les résultats de la diffraction X. En effet les rayonnements infrarouges sont absorbés par les groupements phosphates (PO_4^{3-}) des phosphates de calcium entre $500\text{-}700\text{cm}^{-1}$ et entre $900\text{-}1100\text{cm}^{-1}$. Le pic du OH apatitique, contribution de l’hydroxyapatite, est lui absorbé à 630cm^{-1} . Sur le spectre de granules de BCP 6040 (figure 13) nous pouvons voir les groupements PO_4^{3-} et OH.

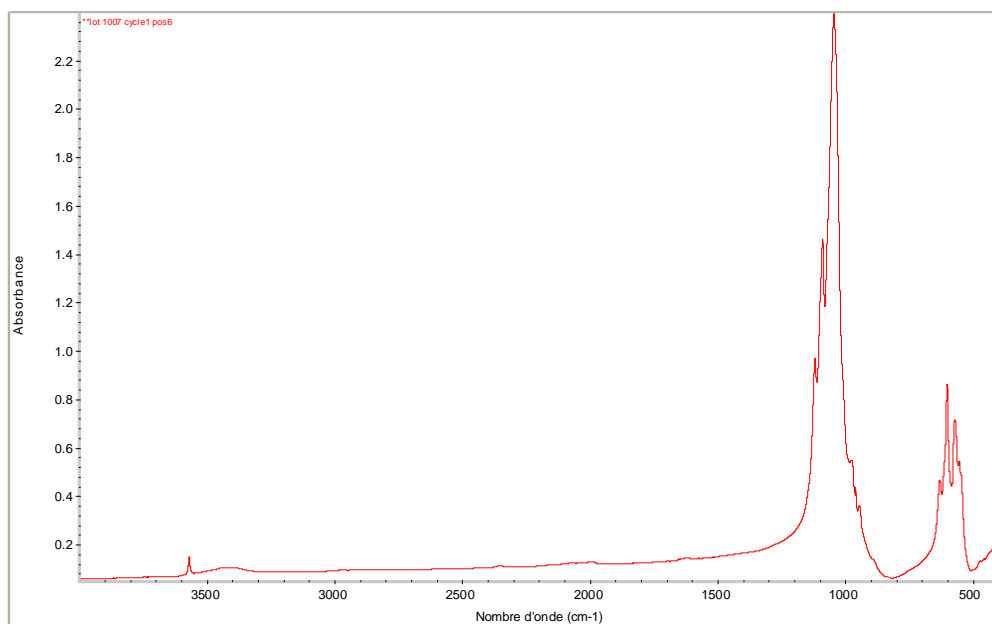


Figure 13 : Spectre d'un phosphate de calcium biphasé (BCP 6040).

(iii) L'observation des granules de BCP par *microscopie électronique à balayage* permet d'apprécier la taille, la forme, la distribution et la microstructure des granules. La figure 14 nous montre les images en observation MEB de granules de BCP 6040. On peut noter que la distribution de taille est comprise entre 80 et 200 μm . A plus fort grandissement, on peut étudier la morphologie d'un granule rond de diamètre de 150 μm . A un grandissement encore supérieur, la microstructure du granule est visible permettant de montrer que ces granules sont fortement microporeux et composés de cristaux de petites tailles (environ 1 μm) lui donnant ses propriétés de bioactivité.



Figure 14 : Observations MEB de granules ronds de BCP à différents grandissement.

(iv) *Détection d'oxyde de calcium (CaO)* dans les céramiques phosphocalciques : L'oxyde de calcium CaO, irritant très puissant (pH 12,5 à saturation dans l'eau), est obtenu par décomposition du CaCO_3 aux environs de 900°C. Après frittage des céramiques

phosphocalciques, on vérifie qu'il n'y a pas présence de ces éléments par un simple test colorimétrique basée sur la basicité de la chaux. On utilise un indicateur coloré de pH sous forme liquide : la phénolphthaléine en solution dans l'éthanol à 95%. Sa zone de virage vers le rose vif est située à pH 8,2 et permet la détection de d'oxyde de calcium.

IV.2. Evaluation de la repousse osseuse d'un matériau phosphocalcique biphasé contenant des nano- micro-particules et des granules macro- micro-poreux

IV.2.1. Introduction

Les céramiques de phosphate de calcium biphasé (BCP) composées d'hydroxyapatite (HA) et de tricalcium phosphate β (β -TCP) sont largement utilisées dans le comblement de défauts osseux dans diverses indications orthopédiques, neurologiques et maxillo-faciales [83] [85] [152] [153]. Une fois implantées, la bioactivité des céramiques de BCP est apportée à la fois par la phase stable composée d'HA et par la phase plus soluble de β -TCP [154]. Après implantation, le matériau se dissout partiellement provoquant la saturation des fluides biologiques favorisant la précipitation d'apatite carbonatée biologique à la surface de la céramique [155] [156]. Cette couche apatitique contient des molécules biologiques et est colonisée par des cellules ostéoprogénitrices qui vont produire par la suite la matrice extracellulaire [157]. Cette configuration permet l'apposition directe du tissu osseux sur la céramique phosphocalcique par phénomène d'ostéoconduction. Dans ce processus, la microporosité obtenue par frittage à basse température procure à la céramique une surface d'échange importante lui procurant sa bioactivité [138]. La macroporosité elle, avec des tailles de pores comprises entre 100 et 600 μm , facilite la circulation et la pénétration des fluides biologiques et des cellules à l'intérieur de la céramique [158]. La macroporosité peut-être obtenue par l'introduction de composés volatiles qui subliment durant la phase de frittage. Cependant, la difficulté réside dans la préparation de céramiques possédant à la fois macro- micro-porosité et propriétés mécaniques. Une autre approche consiste à mettre en suspension des particules de céramique de BCP dans un milieu aqueux [60]. Ce mélange de phases permet d'obtenir des matériaux injectables pour le comblement de structures osseuses complexes et une macroporosité remplacée par les espaces inter-grains [64].

Des travaux antérieurs ont étudié l'effet de la taille de particules de BCP par implantation de différentes granulométries dans des défauts osseux de taille critiques. Ces études ont démontré que la repousse osseuse était meilleure dans des tailles de particules comprises entre 10 et 20 μm comparées à des tailles de 80-100 μm et 200-400 μm [72]. Le nombre de cellules géantes multinucléées et positives à la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) en contact avec le biomatériau était également supérieur pour les 10-20 μm comparé aux autres tailles. Des résultats similaires ont été montrés avec l'implantation de particules de BCP en sites musculaires et où le nombre total de macrophage était significativement supérieur pour les

fractions de particules les plus petites [159]. De plus, le taux de résorption/dégradation des petites fractions de particules de BCP était plus important que pour les plus larges. Ces résultats suggèrent qu'un court phénomène inflammatoire suivant l'implantation de micro-particules de BCP est favorable à l'ostéogénèse. Aussi, de récents travaux ont démontrés le fort pouvoir ostéogénique/ostéoinducteur de céramique biphasée macro- micro-poreux entraînant la formation d'un os minéralisé en site ectopique. [138] [158] [160]. L'inflammation locale provoquée par la microporosité pourrait expliquer ce phénomène d'ostéogénèse [160].

L'objectif de ce travail a été d'étudier les réponses cellulaires et l'ostéogénicité d'une pâte moulable composé de 3 fractions de particules de céramique de BCP. Ce matériau contient une part importante de nano- micro-particules de taille comprise entre 0,1 et 10 μm associées à des granules sphériques microporeux de 80 à 200 μm et de macro- micro-particules de forme irrégulière de taille allant de 0,5 à 1 mm. L'hypothèse de départ a consisté à considérer les étapes suivantes : dans un premier temps (i) la stimulation de la repousse osseuse serait provoquée par l'effet inflammatoire soutenu par les micro-particules et dans un second temps (ii) l'ostéconduction est apportée apporté par les particules de plus grande taille. L'évaluation biologique du matériau a été réalisée par implantation dans des défauts osseux de taille critique d'épiphyse fémorales de lapin à 3, 6 et 12 semaines. La réponse cellulaire, la résorption du matériau et la repousse osseuse ont été évaluées par des techniques histologiques et histomorphométriques. Des granules macro- micro-poreux de BCP de taille 0,5-1 mm ont été utilisés comme contrôle positif de la repousse osseuse.

IV.2.2. *Article*

**Bone growth in a moldable filler containing submicron particles and macro-
microporous granules of biphasic calcium phosphate ceramics**

S. Baroth, G. Daculsi, E. Goyenvalle, E. Aguado, B. H. Fella, Y. Cherel, P. Layrolle

Biomaterials (soumis)

IV.2.3. Discussion

Dans le contexte de la réparation osseuse à minima, les substituts osseux phosphocalciques injectables sont idéaux en permettant une entrée percutanée et le remplissage optimal de cavités osseuses de forme complexe. Deux types de matériaux injectables ont été développés : (i) les ciments hydrauliques phosphocalciques et (ii) les suspensions aqueuses de granules de céramique de phosphate de calcium. La première approche a conduit à un matériau injectable qui s'hydrolyse et durcit *in situ* formant une brushite apatitique [161] [162] [147]. Cependant, ces ciments sont denses et ne possèdent pas de macroporosité permettant la circulation des fluides biologiques et des cellules osseuses à l'intérieur du matériau [90] [163] [164]. Dans la seconde approche, des particules de céramique de phosphate de calcium sont mises en suspension dans une solution aqueuse contenant un polymère hydrophile afin de faciliter l'étape d'injection et d'éviter la sédimentation [60] [148]. Après avoir rempli le défaut osseux avec ce second matériau, les espaces inter-grains assurent une « porosité » interconnectée laissant possible la circulation des fluides biologiques, sa colonisation osseuse et la repousse osseuse. En fonction de la taille des particules de céramique et du ratio céramique/phase aqueuse, différentes porosités peuvent être obtenues. Néanmoins, la cohésion des granules n'est pas suffisante pour un maintien dans le défaut sauf dans le cas de l'utilisation d'un polymère réticulé [64]. En outre, la dégradation *in vivo* des céramiques est relativement lente pour des particules de plus de 10 μm [165]. Ces différentes contraintes nous ont amenés à développer une pâte hydrophile composée de plusieurs tailles de particules de céramique de phosphate de calcium. Ainsi, le mélange de nano- micro-particules mesurant moins de 10 μm à des granules de 80-200 μm et 0,5-1 mm à une solution aqueuse fournit une pâte homogène, moulable et hydrophile (Figures 1 et 2 dans l'article). Le matériau obtenu est facilement extrudé de la seringue, remplit parfaitement le défaut osseux et possède des propriétés hémostatiques (Figure 3a dans l'article). Au vu des résultats biologiques, chaque classe de particule semble jouer un rôle dans le processus de réparation osseuse. Les nano- micro-particules inférieures à 10 μm sont rapidement dégradées par phagocytose intense et dissolution rapide apportées respectivement par une surface d'échange importante et leur petite taille (Figure 5 dans l'article). Après 3 semaines d'implantation, les résultats histologiques montrent qu'une grande partie des nano- micro-particules ont été phagocytées par des macrophages laissant des espaces libres entre les granules de plus grande taille favorisant l'ostéoconduction en profondeur. (Figure 4 dans l'article). Malard *et al*, ont montré

l'effet micro-particules sur la repousse osseuse dans un modèle d'épiphyse fémorale de rat [72]. Ces travaux montre que des particules de BCP de 10-20 μm promeuvent une repousse osseuse plus rapide et plus importante que des particules de 80-100 μm ou 200-400 μm après 21 jours d'implantation. Sept jours après l'implantation, la dégradation des particules de 10-20 μm est corrélée avec la présence de nombreuses cellules multinucléées TRAP positives. Cette inflammation locale, dans les premières étapes de cicatrisation, et due aux particules de 10-20 μm , semble améliorer le processus de réparation osseuse. Les étapes précoces de cicatrisation osseuse, impliquent le recrutement de cellules multinucléées, la libération de cytokines, la revascularisation et enfin la formation osseuse [72] [129] [166] [167]. Dans notre étude, aucune cellule mutinucléée TRAP positive n'a pu être observée après 3 semaines d'implantation (Figure 6 dans l'article). A ce stade, la majorité des nano- micro-particules a été dégradée par de nombreux macrophages (Figure 4 dans l'article). La taille des particules est compatible avec le processus de phagocytose impliquant les macrophages [166]. Après 3 semaines après la dégradation des plus petites particules de céramique, la repousse osseuse est d'environ 21% (Figure 5). La résorption des particules par les cellules s'accompagne de la libération de cytokines et d'ions phosphate et calcium [167]. Ces cytokines entraînent le recrutement de cellules ostéoprogénitrices et leur différenciation en ostéoblastes [168] favorisant la production de matrice extracellulaire. Des travaux ont montré que la libération de cytokines pro-inflammatoires [interleukines (IL-1 et IL-6) et tumor necrosis factor (TNF- α)] était significativement augmentée lorsque l'on cultivait des macrophages en présence de micro-particules d'HA de 1 à 3 μm [169]. Toutefois, ces cytokines pro-inflammatoires sont connues pour inhiber la différenciation ostéoblastique *in vitro*. Il a également été montré que les micro-particules de BCP augmentaient la production de facteurs de la résorption osseuse comme la prostaglandine E₂ et diminuaient le taux de prolifération [170] [171]. Néanmoins les mécanismes peuvent être différents *in vivo* où cohabitent plusieurs types cellulaires pendant la phase de réparation. En effet, il a été montré qu'une inflammation locale de courte durée est nécessaire à la cicatrisation d'un tissu [172]. Notre postulat repose donc sur un enchainement de réactions biologiques induites par les différentes classes de particules de céramiques phosphocalciques. Dans les étapes précoces, les nano- micro-particules sont dégradées par les cellules géantes multinucléées ou les macrophages, initiant la libération de cytokines pro-inflammatoire et d'ions phosphate et calcium. Ces signaux induisent par la suite, le recrutement des cellules ostéoprogénitrices produisant de la matrice extracellulaire au contact des granules de BCP. Le pouvoir ostéogénique favorable a été démontré par la

combinaison de plus petites et de plus larges particules. La dégradation des nano- micro-particules favorise la repousse osseuse supportée ensuite par les granules de plus grande taille. A travers ce processus, un niveau physiologique d'os est rapidement été atteint. Après 3, 6 et 12 semaines d'implantation, en comparaison avec le matériau de référence (granules irréguliers macro- microporeux de BCP de taille 0,5 à 1 mm) la cinétique de repousse osseuse obtenue avec notre matériau est similaire (Tableau 1 dans l'article). Ce délai peut-être expliqué par le temps requis pour dégrader les nano- micro-particules pour laisser place à la repousse osseuse. Un délai d'implantation inférieur à 3 semaines, aurait pu montrer d'avantage de différences entre ces 2 matériaux (« pâte » de BCP ou granules 0,5-1 mm seuls). Des travaux supplémentaires pourraient conduire à déchiffrer les événements précoces de cicatrisation en présence de nano- micro-particules.

IV.2.4. Conclusion

Le contenu en nano- micro-particules est rapidement dégradé par les cellules de résorption suivi par l'angiogénèse et l'ostéogénèse assurée par l'ostéoconduction apportée par les larges particules de BCP. Cette pâte innovante peut-être utilisée dans plusieurs indications orthopédiques, du rachis ou maxillo-faciales. Ces recherches ont permis d'obtenir la marquage CE du matériau (n° CE 0123, certificat n° G7 08 10 32283 021) et est fabriqué et distribué par la société Biomatlante sous les différents noms commerciaux Hydros® ou MBCP nano®.

IV.3. Optimisation des suspensions granulaires phosphocalciques injectables : les Polymères

Nous avons pu constater que l'amélioration des matériaux injectables pour la reconstruction osseuse (et spécifiquement les suspensions) passait par l'amélioration de la phase contenant les particules et celles contenant la phase vectrice. Cette dernière peut être constituée d'une solution aqueuse comme évoqué dans les travaux précédents avec le développement d'une pâte constituée de granules de céramiques mélangés à de l'eau (Hydros®) ou de polymères synthétiques ou naturels comme l'HPMC avec l'IBS1 (MBCP Gel®) et la colle de fibrine avec le TricOsT® ou les thermosensibles avec le projet Citagel.

De nouveaux polymères ont été développés dans le cadre du projet ANR BioRimp pour satisfaire certaines contraintes liées aux indications et aux problèmes de l'utilisation d'une charge minérale sous forme de granules de phosphate de calcium.

IV.3.1. Projet NewGel

Un premier projet est donc né : le NewGel. Celui-ci est basé sur les propriétés de réticulation par irradiation, de l'association d'un polymère cellulosique (HPMC) à un autre polymère ionique (hyaluronate de sodium, CMC-Na...). La réticulation par rayonnement beta à haute dose possède en plus l'avantage de stériliser le produit qui est une étape importante du développement d'un dispositif médical comme les matériaux à base de polymères et de phosphates de calcium. Ce nouveau polymère et ses associations avec des charges minérales a été breveté par la société Biomatlante [2]. La biocompatibilité du composite polymère/granules de BCP a été testée *in vitro* selon la norme ISO 10993-5 (inclus dans le brevet) et ses performances ostéogéniques vérifiés chez le lapin et chez la chèvre (modèle de vertébroplastie). Les propriétés mécaniques pour satisfaire à une indication en vertébroplastie ont été mesurées par le développement d'un modèle original.

Biocompatibilité et performances du composite NewGel : études *in vitro* et *in vivo*.

IV.3.1.1.1. Objectifs

Mise au point de la formulation et études des performances mécaniques, de la biocompatibilité et des propriétés ostéogéniques du composite.

IV.3.1.1.2. Matériels et méthodes

(i) Formulation : Se référer au brevet « Hydrogel et ses applications biomédicales » (PCT/EP2007/062470)

(ii) Modèle d'os trabéculaire

Les propriétés mécaniques du composite ont été déterminées en développant un modèle d'os trabéculaire. Dans un premier temps à partir de vertèbres de mouton puis à partir de carottes calibrées (5 mm de diamètre par 30 mm de longueur) prélevées au niveau d'épiphyse fémorales bovines pour une meilleure reproductibilité. Un défaut calibré a été créé par forage de cylindre de 5 mm de diamètre par 20 mm de profondeur (Figure 15). Les modèles ont ensuite été comblés à l'aide du composite. Les résistances mécaniques en compression du modèle sans défaut, avec défaut vide ou défaut comblé ont été mesurées (Banc de compression, MTS Renew, Test Works) (Figure 16). La vitesse d'écrasement appliquée a été de 10 mm/min. Les valeurs à rupture ont été relevées pour comparaison.

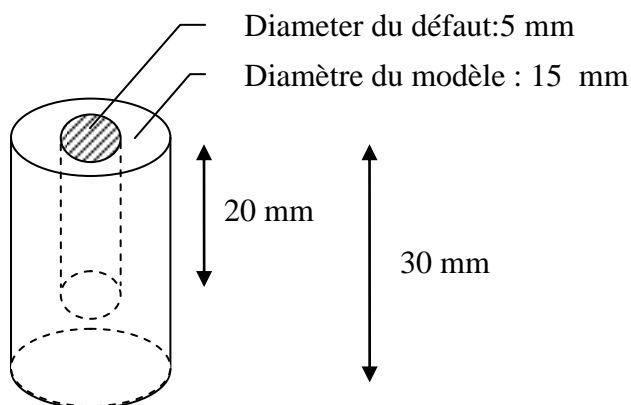


Figure 15 : Préparation et dimension du modèle d'os trabéculaire bovin.

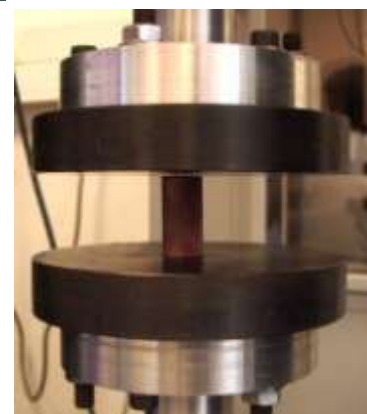


Figure 16 : Banc de compression (MTS Renew).

(iii) Mesure de la déformation et de la résistance mécanique en compression d'un ballonnet pour kyphoplastie rempli du composite

Afin de vérifier la possibilité d'utiliser le composite NewGel en kyphoplastie, nous avons effectué des essais mécaniques préliminaires en combinant des ballonnets de kyphoplastie au composite. Les ballonnets remplis du matériau ont ensuite subi une compression (MTS Renew, 10 mm/min) (Figure 17). La déformation du ballonnet et sa résistance en compression ont été mesurées.

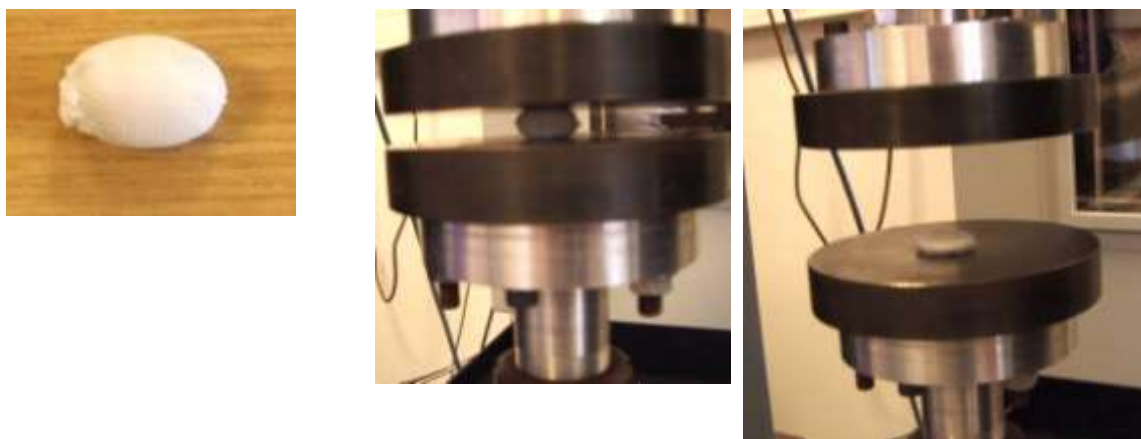


Figure 17 : Remplissage et compression d'un ballonnet de kyphoplastie rempli du composite NewGel.

(iv) Propriétés de gonflement du NewGel

Il apparaît qu'après réticulation par irradiation, le composite NewGel gonfle lorsqu'il est en contact avec un liquide. Nous avons donc effectué des essais afin de déterminer le gonflement du composite seul et dans le ballonnet de kyphoplastie.

Trois ballonnets sont remplis avec le composite avec les volumes suivants: 2, 2,5 et 2,2 ml. Le composite seul ou associé aux ballonnets sont ensuite immergés dans une solution physiologique (0,9%) pendant 18h à 37°C. Les différents volumes pompés par les systèmes sont ensuite mesurés.

(v) Performances et biocompatibilité *in vivo* chez le lapin

Trois lapins New Zealand White ont été implantés selon les bonnes pratiques de laboratoire. Avant implantation, les lapins sont anesthésiés par injection intramusculaire de xylazine (5 mg/kg) et de ketamine (35 mg/kg). Des cavités ont été créées (6 mm de diamètre par 8 mm de profondeur) au niveau des épiphyses proximales distales. Les cavités ont été nettoyées par

irrigation de sérum physiologique puis comblées par le composite NewGel en évitant la formation d'espaces vides. Les implants ont été maintenus en place pendant 6 semaines.

(vi) Biofonctionnalité *in vivo* chez la chèvre

Les corps vertébraux de chèvres ont été comblés avec le composite NewGel en utilisant le même matériel et les mêmes procédures chirurgicales de vertébroplastie que chez l'homme.

Six chèvres ont été implantées. Des défauts (1,5 ml) ont été réalisés au niveau des corps vertébraux de vertèbres cervicales C3 et C5. Le matériau est resté en place pendant 6 mois.

(vii) Préparation des explants

Après euthanasie, les échantillons sont analysés par microtomographie X. Ils sont ensuite fixés dans une solution de formol neutre 1/9, déshydratés dans des bains croissant d'éthanol et d'acétone pure et enfin imprégnés et inclus en résine glycol/MMA

Les biopsies sont observées par des techniques de microscopies optiques et électroniques (MEB). Chaque bloc de résine est découpé en 2 parties au niveau du site d'intérêt selon l'axe sagittal à l'aide d'une scie diamantée (Leica Leitz). Pour l'observation en MEB, les surfaces obtenues après coupe (Leitz) sont métallisées à l'or/palladium avant leur observation en électrons rétrodiffusés (15kV) couplé à de l'analyse d'image permettant de déterminer les quantités d'os néoformée et de matériau résorbé. Des coupes de 7 μm ont également été préparées (microtome, Reichert-jung 2050) et ensuite colorées en pentachrome de Movat ou hématoxyline/éosine pour l'observation en microscopie optique du comportement du tissu au matériau. Pour l'observation en lumière polarisée des coupes de 90 μm ont été préparées (Leitz).

IV.3.1.1.3.

Résultats

(i) Modèle d'os trabéculaire bovin :

Les premiers essais utilisant les modèles de vertèbres de mouton n'ayant pas de résultats assez reproductibles, nous avons développé un modèle reproductible en prélevant des cylindres calibrés d'os trabéculaire et en les remplissant ou non de composite NewGel.

Au vue des premiers résultats, il s'est avéré que le modèle n'était pas complètement reproductible en fonction de l'animal, de son âge et de la zone de prélèvement d'os trabéculaire et qui induit des propriétés mécaniques différentes comme on peut le voir sur la figure 18 où la rupture des carottes d'os est différente.

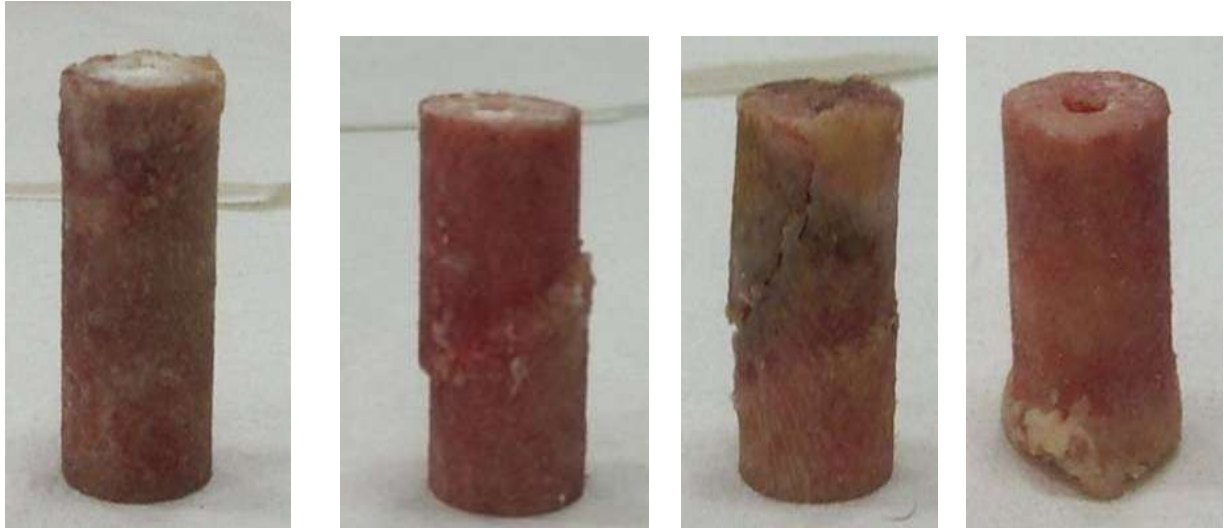


Figure 18 : Fractures induites par compression uniaxiale de carottes calibrées d'os trabéculaire bovin.

Néanmoins en comparant les propriétés mécaniques des modèles d'os trabéculaire, plein, vide, rempli composite (n=6), on observe une tendance qui tend à montrer que l'ajout de composite rétabli les propriétés mécaniques initiales avec peut de fluage à l'intérieur des travées (Figure 19).

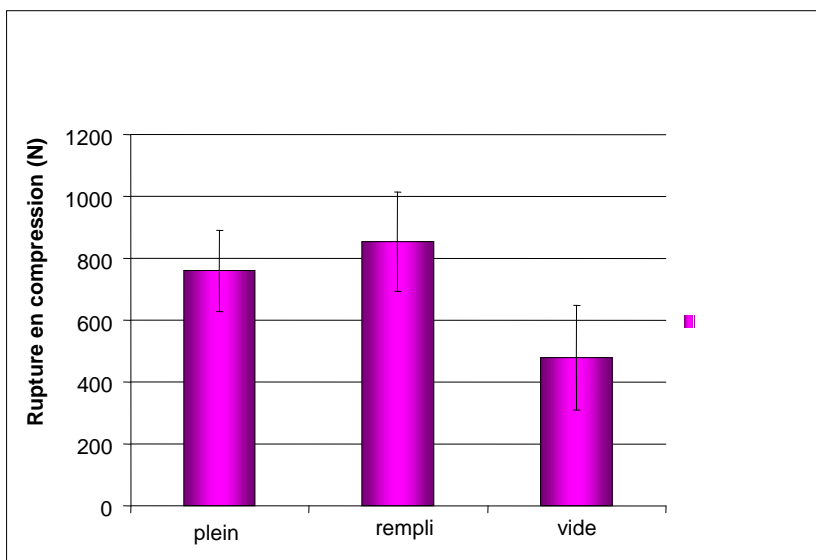


Figure 19 : Rupture en compression du modèle d'os trabéculaire bovin. Comparaison du modèle plein versus vide et rempli du composite NewGel.

(ii) Résistance mécanique composite NewGel/ballonnetts kyphoplastie

Deux types de ballonnetts ont été testés, un à mailles serrées et l'autre à larges mailles. Quelque soit le ballonnet utilisé, le ballonnet rempli de composite a le même comportement : écrasement de 40% avec fuite du polymère uniquement au travers des mailles. Après 40% d'écrasement, le matériau conserve à épaisseur constante des propriétés mécaniques élevées (750 N) (Tableau 8).

	Ballonnet 1 (maille serrée)	Ballonnet 2 (maille large)
Épaisseur du ballonnet à 40 N	10,5 mm	11,2 mm
Épaisseur du ballonnet après compression (7500 N)	6,25 mm	6,25 mm

Tableau 8 : Mesure de l'écrasement et des propriétés mécaniques de l'association du composite NewGel à un ballonnet pour kyphoplastie.

(iii) Gonflement du composite NewGel

Le volume de la solution physiologique absorbée par le composite seul est d'environ 80%. Associé aux ballonnetts de kyphoplastie, le gonflement celui n'est plus que de 20%. Cette diminution d'absorption est attribuée au ballonnet qui empêche le gonflement maximum du composite. Nous avons pu observer que le composite, même sous contrainte de gonflement dans le ballonnet, restait en place.

Ces résultats préliminaires nous permettent de penser que le composite NewGel possède suffisamment de propriétés mécaniques pour être associé à des techniques de vertébroplastie. Ces résultats ne sont néanmoins pas définitifs et doivent être affinés en utilisant des modèles plus reproductibles.

Cytotoxicité in vitro (ISO 10993-5): Se référer au brevet « Hydrogel et ses applications biomédicales » (PCT/EP2007/062470)

(v) Performances et biocompatibilité in vivo chez le lapin

Les observations histologiques sont les suivantes :

- Pas de complications cliniques
- Pas de signe à corps étranger
- Gonflement en dehors du défaut osseux
- Pas d'inflammation

Les coupes histologiques colorées à l'hématoxyline éosine nous montrent que l'implant est entièrement colonisé par les cellules (Figure 20). Après 6 semaines seuls quelques résidus de polymère sont encore présents. Les granules de BCP sont toujours en place. La densité cellulaire est très importante et essentiellement constituée de cellules géantes de type macrophage. Ces cellules impliquent un phénomène important de résorption du polymère et de la céramique. Après 6 semaines la repousse osseuse est limitée par le gel réticulé. Aucun phénomène d'ostéolyse n'a pu être observé à la périphérie de l'implant avec la présence de quelques travées osseuses sur les granules. Le centre du défaut contient beaucoup de granules et de polymère.

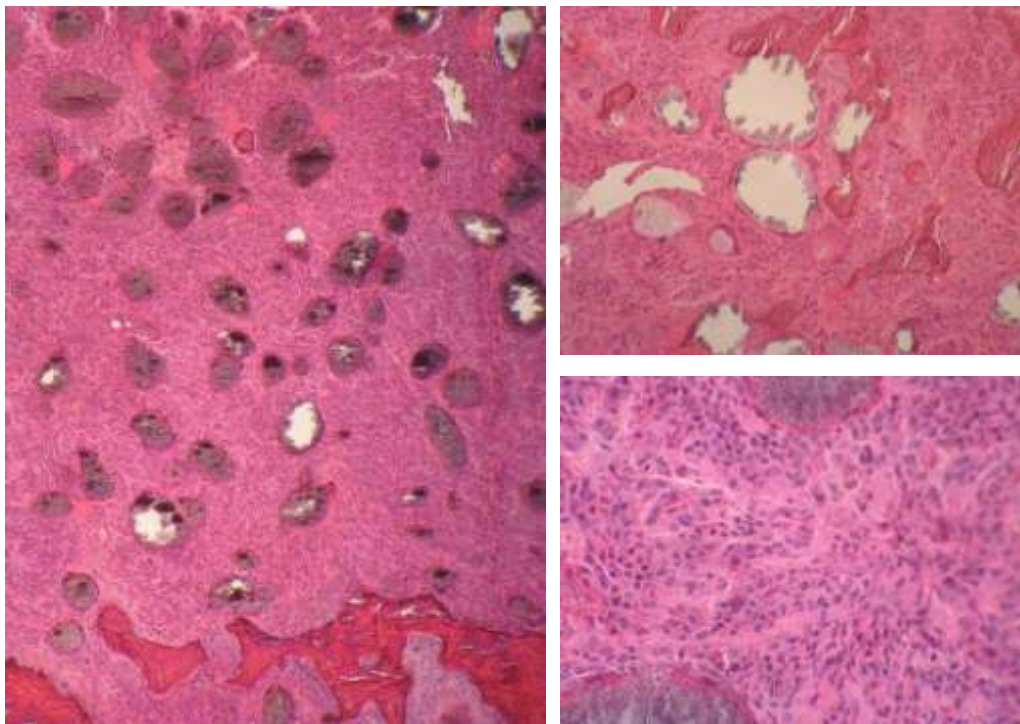


Figure 20 : Coloration HES du composite NewGel à 6 semaines d'implantation en site osseux chez le lapin. La colonisation des cellules géantes de résorption est intense.

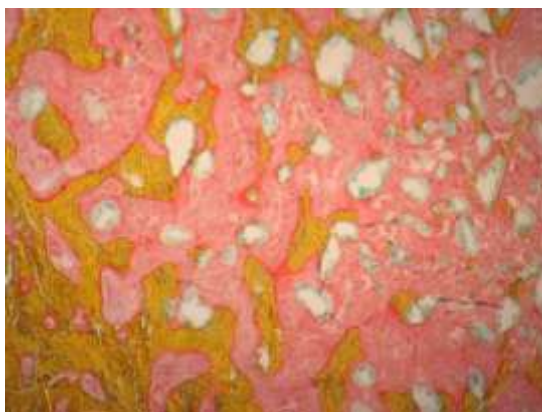


Figure 21 : Coloration MOVAT du composite NewGel à 6 semaines d'implantation en site osseux chez le lapin. L'ostéoconduction est supportée par les granules de BCP.

La coloration au pentachrome de Movat (Figure 21) nous permet d'observer la repousse osseuse en périphérie de l'implant associée à la résorption des granules du à sa forte bioactivité

Le gonflement du composite est parfaitement mis en évidence par MEB. La diffusion hors du défaut osseux est de l'ordre du millimètre. Pendant l'explantation, ces excroissances semblaient dures et minéralisées. L'observation MEB nous permet également de montrer la résorption importante des granules de BCP et les travées osseuses en périphérie (Figure 22).

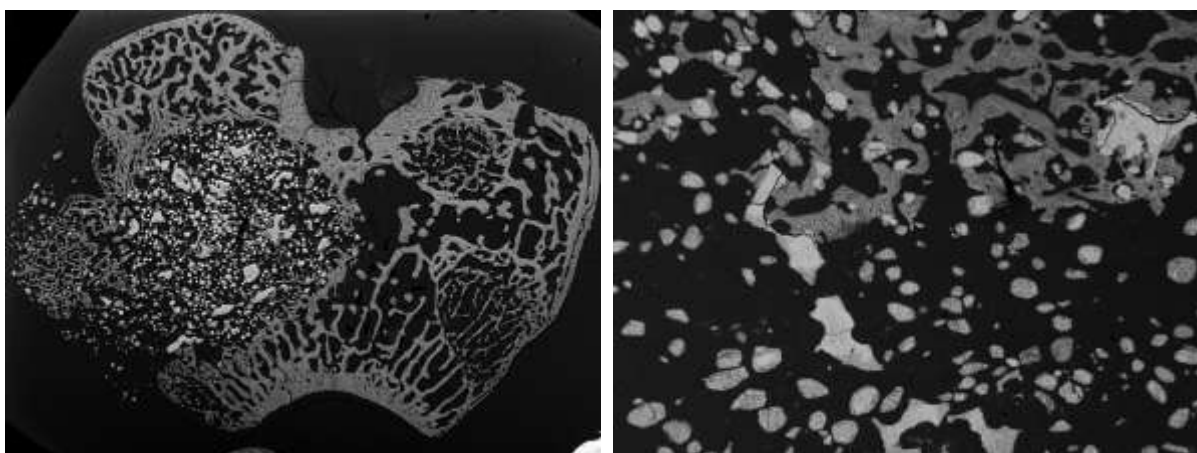


Figure 22 : Observation MEB du matériau implanté dans l'épiphyse fémorale de lapin à faible et fort grandissement.

La résorption des granules de BCP est supérieure en périphérie du à la colonisation osseuse précoce. La réticulation limite la diffusion des macrophages dans le gel. Après résorption du gel, les macrophages restent en place expliquant la forte résorption du BCP. Les travées osseuses sont formées par ostéoconduction à partir du tissu hôte.

(vi) Biofonctionnalité *in vivo* chez la chèvre

Après implantation du matériau pendant 6 mois dans les corps vertébraux de chèvres, aucune réaction à corps étranger n'a pu être observée.

La microscopie optique nous permet d'observer de larges travées osseuses formées de la périphérie de l'implant vers l'intérieur par phénomène d'ostéoconduction apportée par les granules de BCP (Figure 23). On retrouve un nombre de cellules hématopoïétiques (moëlle osseuse) supérieure à ce que observé chez le lapin.

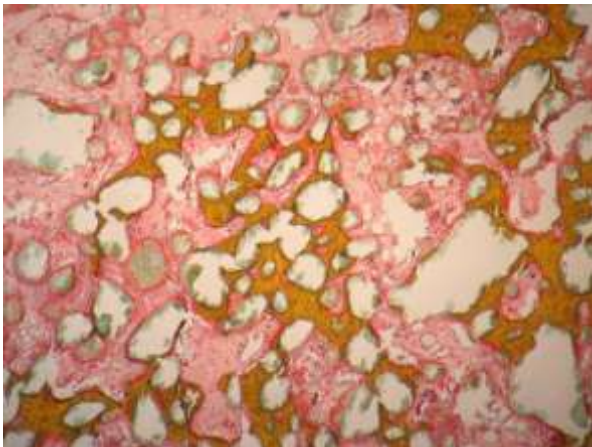


Figure 23 : Coloration MOVAT du composite NewGel à 6 mois d'implantation en site osseux chez la chèvre. On peut voir l'ostéoconduction des travées osseuses sur les granules de BCP.

L'observation MEB nous permet de confirmer la formation d'un tissu osseux mature dans l'ensemble du corps vertébral montrant le potentiel ostéogénique du composite NewGel

L'histomorphométrie nous permet le calcul des surfaces du matériau et de la repousse osseuse.

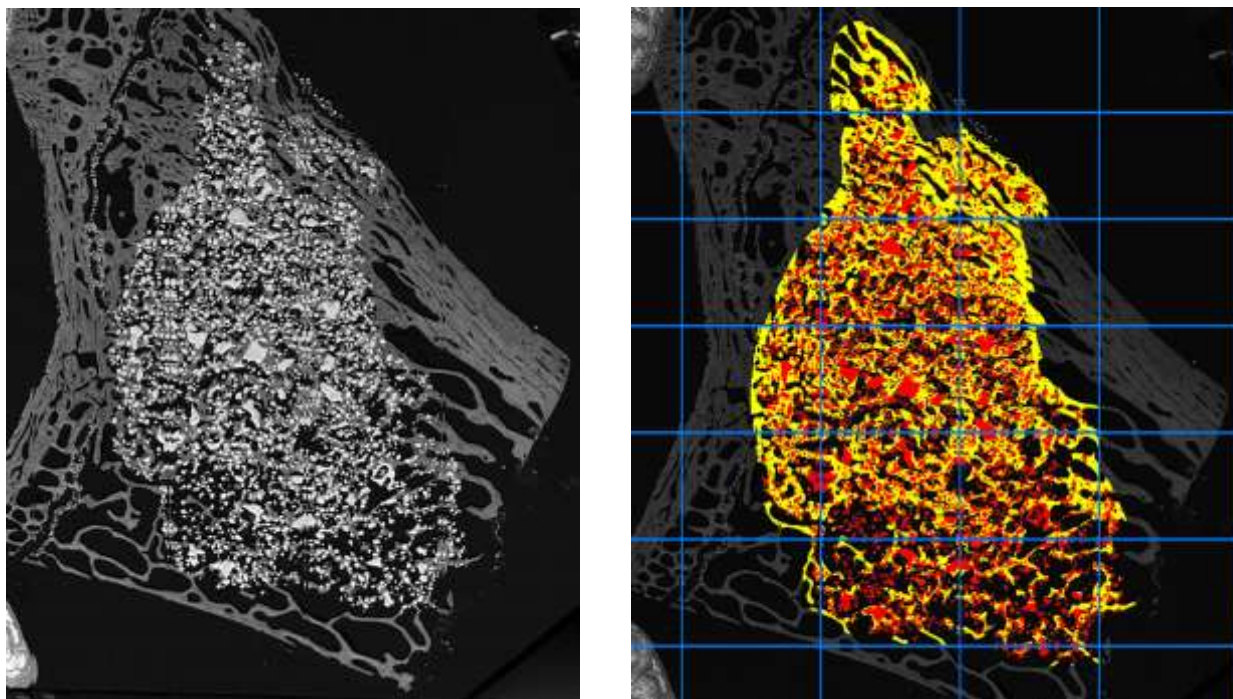


Figure 24 : Observation MEB de composite NewGel implanté dans le corps vertébral de chèvre et analyse d'image par traitement de gris.

	Corps vertébraux comblés avec le composite NewGel	Corps vertébraux sains
% tissu osseux minéralisé	21,4 ± 6,7	30,1 ± 11,4
% tissus moux	54,3 ± 7,8	70 ± 11,3
% granules de BCP	24,4 ± 3,8	-

Tableau 9 : Mesure de repousse osseuse et de résorption du matériau après 6 mois d'implantation en site vertébral chez la chèvre. Comparaison à un corps vertébral sain.

IV.3.1.1.4.

Conclusion

Le composite NewGel est un matériau injectable et moulable facile à manipuler. Il semble également proposer des propriétés mécaniques intéressantes pour des indications en vertébroplastie et/ou la kyphoplastie. Les études *in vitro* et *in vivo* nous permettent d'affirmer que le matériau est biocompatible et qu'il possède des propriétés ostéogéniques apportées par les granules de BCP chez le lapin ou la chèvre.

Comparé aux matériaux injectables similaires, le polymère réticulé semble ralentir la colonisation cellulaire et la repousse osseuse n'est possible qu'après dégradation du polymère. Les cellules de dégradation et les macrophages sont toujours présents après 6 semaines d'implantation ce qui permet la dégradation active à la fois du polymère et des granules. Des résultats équivalents ont été observés dans d'autres matériaux possédant un polymère réticulé (colle de fibrine et granules de BCP avec le TricOsT)

Les performances de repousse osseuse dans le modèle de vertébroplastie chez la chèvre sans ballonnet confirment, en plus des propriétés mécaniques, le potentiel de ce matériel pour cette indication.

Enfin, les propriétés de gonflement du composite ont l'avantage de parfaitement combler le défaut et même d'induire une pression sur les parois de la cavité permettant l'activation par stimuli mécaniques des cellules ostéoprogénitrices.

IV.3.1.1.5. Brevet NewGel : « Hydrogel et ses applications
biomédicales » (PCT/EP2007/062470)

IV.3.2. *Projet CitaGel*

IV.3.2.1. Introduction

Le projet CitaGel est le projet le plus récent. Le CitaGel est un matériau injectable thermosensible pour la réparation osseuse. Il est basé sur l'association de granules de BCP pour la bioactivité et l'ostéogénicité et d'un polymère biocompatible et biodégradable thermosensible de type poloxamère (Pluronic/Lutrol) permettant la cohésion des granules entre eux. Le polymère a la propriété d'être liquide à basse température et sous forme de gel à 37°C. Cette propriété et la bioactivité apportée par les granules de BCP permettent l'obtention d'un matériau facilement injectable et moulable par la suite pour un maintien parfait dans le défaut osseux. Ce travail préliminaire visant à évaluer les performances du matériau chez l'animal a été réalisé à partir de 2 types de granules, en BCP 6040 et BCP 2080. Il a été présenté en communication orale au 25^{èmes} Journées Scientifiques du Collège Français de Biomatériaux Dentaires (cfbd) [173]

Les poloxamères sont des triblocs de copolymères non ioniques composés d'une chaîne centrale hydrophobe d'oxyde de polypropylène (PPO) entourée de 2 chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène (POE) (Figure 25). L'invention fut brevetée en 1973. Les poloxamères sont plus connus sous le nom de la marque commerciale Lutrol/Pluronic. De nombreux poloxamères sont disponibles et résultent de la modification de la longueur des chaînes polymériques qui donne des propriétés différentes. Les noms des Lutrol/Pluronic sont associés à leurs propriétés. La première lettre correspond à l'état physique à température ambiante (L=liquide, P=pâte et F=flake=solide) suivie par 2 ou 3 numéros. Le premier numéro (les 2 premiers lorsqu'il y a 3 numéros) x 300 indique la masse moléculaire de la chaîne hydrophobe et le dernier numéro x 10 donne le pourcentage de POE. Le pluronic F127 utilisé dans notre étude est donc solide à température ambiante avec une chaîne de PPO de 3600 g/mole et contenant 70% de POE.

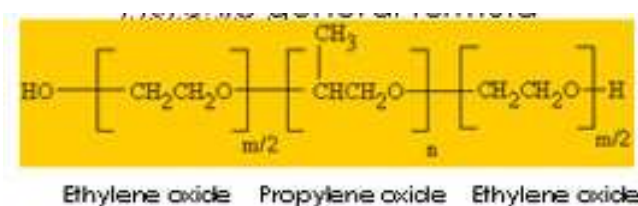


Figure 25 : Formule générale d'un poloxamère.

IV.3.2.2. Biocompatibilité et performances du composite CitaGel : études *in vivo*.

IV.3.2.2.1. Objectifs

Mise au point de la formulation et études de la biocompatibilité et des propriétés ostéogéniques du composite.

IV.3.2.2.2. Matériels et méthodes

(i) Formulation

Plusieurs formulations ont été mises au point basées sur l'association de granules ronds 80-200 μm de BCP (rapport HA/ β -TCP de 60/40 ou 20/80) et du polymère Pluronic/Lutrol F127. La contrainte initiale était de préparer un mélange de ces 2 phases afin d'avoir une charge minérale maximale tout en permettant une injectabilité aisée à travers une seringue 1 ml de type MBCP-Gel.

(ii) Biocompatibilité et ostéogénicité du matériau : essais *in vivo* chez le lapin

Dix lapins White New Zealand, ont été implantés selon les bonnes pratiques de laboratoire. Avant implantation, les lapins ont été anesthésiés par injection intramusculaire de xylazine (5 mg/kg) et de ketamine (35 mg/kg). Des cavités ont été formées par forage (défauts de taille critique de 6 mm de diamètre par 8 mm de profondeur) au niveau des épiphyses proximales distales. Les cavités ont été nettoyées par irrigation de sérum physiologique puis comblées avec le composite CitaGel 2080 ou 6040. Ces mêmes matériaux ont été implantés dans les muscles lombaires bilatéralement (1 ml). Les délais d'implantation sont de 3 et 6 semaines.

(iii) Préparation des explants

Les explants sont traités de la même façon que pour l'étude NewGel : fixation formol neutre 1/9, déshydratation, inclusion en résine acrylique, coupe et coloration histologique.

IV.3.2.2.3. Résultats

(i) Formulation

Différentes formulations (ratios hydrogel / granules) ont été préparées à l'aide de l'hydrogel et des différents type de granules (variation dans le ratio HA/TCP).

Les mélanges ont été réalisés dans un bécher en verre maintenu réfrigéré dans un bac à glace. L'hydrogel est d'abord versé dans le bécher et pesé. Les granules sont ensuite progressivement ajoutés et mélangé à l'aide d'une spatule jusqu'à obtention d'une pâte homogène et fluide. La masse de granules est également mesurée.

Les seringues sont remplies par aspiration du composite. Les différents mélanges sont ensuite extrudés manuellement. La méthode d'évaluation est qualitative. Les valeurs (basées sur la limite d'incapacité à extruder manuellement les matériaux) et résultats sont résumés dans le tableau 10.

<u>Produit A</u> : hydrogel + granules BCP 6040 ronds 80-200µm		
	Hydrogel thermo réticulable	Granules ronds BCP 6040 (quantité maximale pour extrusion)
Quantités massiques testées	5g	8,5g
% (w/w)	37%	63%

<u>Produit B</u> : hydrogel + granules BCP 2080 ronds 80-200µm		
	Hydrogel thermo réticulable	Granules ronds 20/80 (quantité maximale pour extrusion)
Quantités massiques testées	5g	6g
% (w/w)	45,5%	54,5%

Tableau 10 : Ratio polymère thermosensible/granules CaP, compatibles avec l'extrusion.

Les granules de BCP 6040 ou BCP 2080 n'ont pas les mêmes ratios de HA ou β -TCP. Cette différence se traduit par une microstructure différente et donc une absorption différente du

polymère par la microporosité des granules. Ainsi l'absorption du polymère semble être supérieure avec les granules de BCP 2080 (Figure 26). L'injectabilité des différentes formulations obtenues est très facile.

(ii) Biocompatibilité et ostéogénicité du matériau : essais *in vivo* chez le lapin

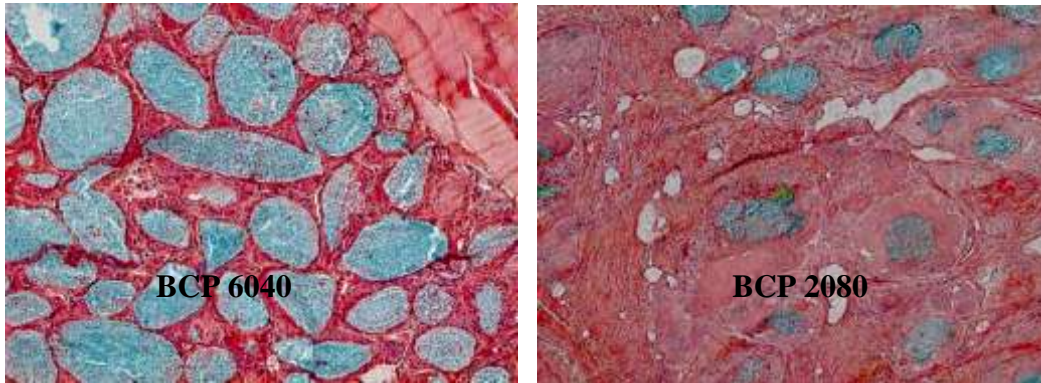


Figure 26 : Composites CitaGel 6040 et 2080 en site musculaire à 6 semaines. Coloration HES.

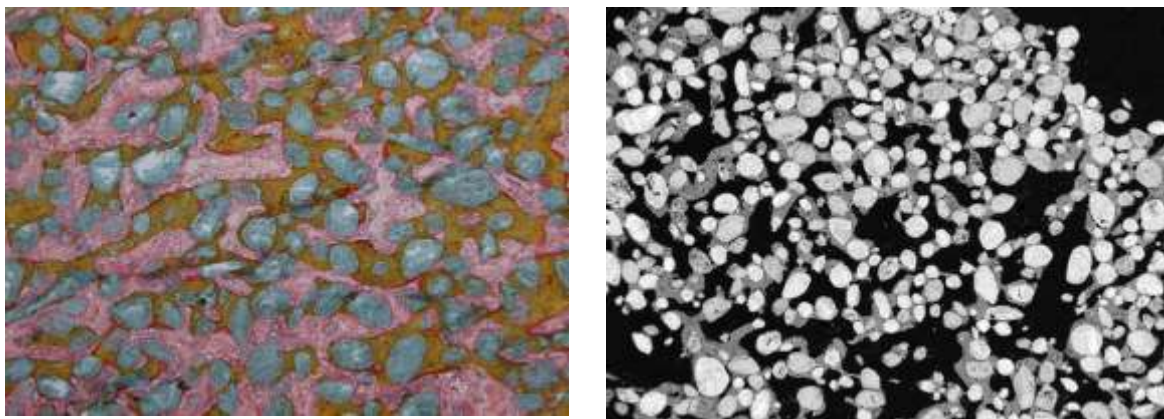


Figure 27 : Composite CitaGel 2080 implanté en site osseux à 6 semaines. Coloration Movat et MEB rétrodiffusé.

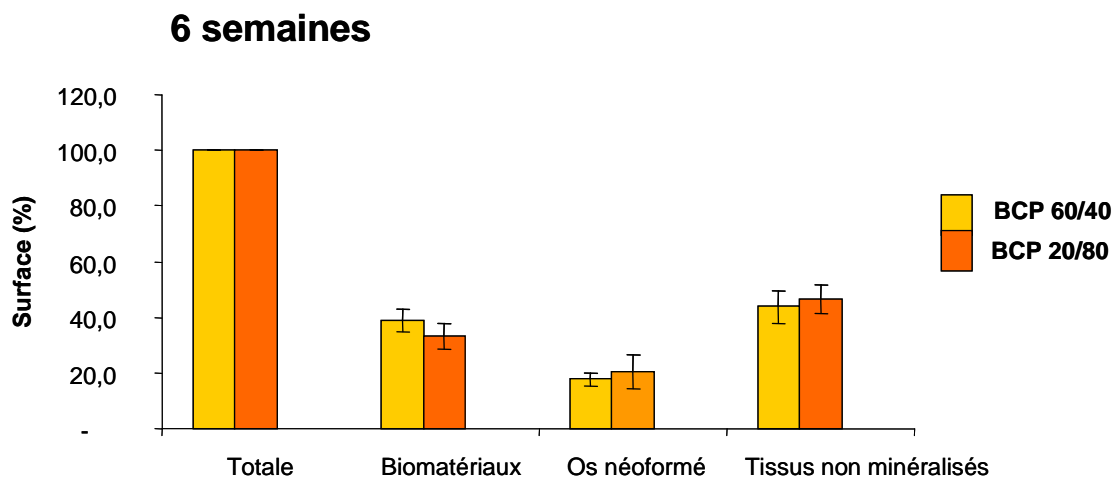


Figure 28 : Repousse osseuse du composite CitaGel 6040 vs composite CitaGel 2080

IV.3.2.3. Conclusion

Aucune réaction à corps à corps étranger n'est observée ni après 3 semaines, ni après 6 semaines d'implantation. En site musculaire, les granules de BCP 2080 sont résorbés beaucoup plus rapidement que ceux composés de BCP 6040 du à la plus grande proportion de β -TCP plus résorbable que l'HA (Figure 26). Après 6 semaines d'implantation, la qualité et la quantité de repousse osseuse est identique quelque soit le matériau utilisé (Figures 27-28).

En conclusion, le composite CitaGel 6040 ou 2080 est un matériau facile à utiliser qui possède des propriétés hémostatiques intéressantes lors de la chirurgie. Le suivi histologique nous a montré que le matériau est biocompatible. Le polymère disparaît en moins de 3 semaines. Le matériau est ostéogénique et ostéoconducteur avec une repousse physiologique dès 3 semaines (ostéoconductivité portée par les granules ronds de BCP). Le taux de repousse osseuse est identique quelque soit la formulation utilisée avec cependant une cinétique de résorption supérieure pour celle contenant les granules de BCP 2080

IV.4. Amélioration de la radiopacité des matériaux injectables à base de granules de BCP

IV.4.1. Introduction

La chirurgie à minima (MIS) et particulièrement la chirurgie osseuse du rachis comme la vertébroplastie ou la kyphoplastie [174] [175] nécessite l'utilisation de matériaux suffisamment radiopaques. L'intervention est surveillée sur un écran d'imagerie par fluoroscopie afin que le radiologue s'assure du site d'implantation et de l'absence de refoulement du matériau dans le canal rachidien. Les ciments acryliques utilisés dans ces indications pour renforcer le corps vertébral [176] sont rendus radiopaques par ajout de poudre de composés radiopaques comme le sulfate de baryum, de la poudre d'oxyde zirconium ou de la poudre de tungstène [114] [175]. Actuellement, les matériaux synthétiques en phosphate de calcium sont très largement utilisés en régénération osseuse pour leurs propriétés ostéogéniques dues à leur composition proche de la fraction minérale de l'os. Contrairement aux résines acryliques, les céramiques phosphocalciques sont résorbables et bioactives et sont donc plus adaptées à une implantation sur le long terme (durée de vie des ciments acryliques = 5 à 10 ans). Néanmoins plus dense que les ciments acryliques, les céramiques phosphocalciques doivent être rendues d'avantage radiopaque et spécialement en chirurgie du rachis.

La chirurgie à minima utilise des matériaux injectables décrits tout au long de ce travail, à savoir les ciments phosphocalciques ou les suspensions phosphocalciques. Ces matériaux sont basés sur le « granule concept ». Le contraste des matériaux peut donc être amélioré en rendant d'avantage radiopaque soit la phase vectrice comme les polymères soit la phase contenant les granules de céramiques. Deux matériaux en phosphate de calcium ont été développés et dont les performances ont été testées.

IV.4.2. Optimisation de la radiopacité d'un substitut injectable (MBCP Gel®) pour la réparation osseuse à minima.

IV.4.2.1. Introduction

Le MBCP Gel est un substitut osseux injectable composé de granules de BCP de 80-200 µm en suspension dans une solution polymérique d'HPMC à 3%. L'efficacité du composite en vertébroplastie a été démontrée par des études précliniques en 2005 [177]. L'objectif de cette étude est de montrer l'efficacité (radiopacité et ostéogénicité) du MBCP Gel reconstitué par une solution iodée. Le procédé de lyophilisation du polymère pour reconstitution a été breveté et le travail suivant a été publié [120].

IV.4.2.2. Matériels et méthodes

Le MBCP Gel en seringues de 1 ml nous a été fourni par la société Biomatlante (Vigneux de Bretagne, France). Les seringues ont été lyophilisées afin de d'enlever toute l'eau contenue dans le polymère. Une solution iodée commerciale (Ioméron, iode à 350 mg/ml) a ensuite été utilisée à volume équivalent pour remplacer le volume d'eau retiré par lyophilisation. L'ensemble a été homogénéisé dans la seringue par un système permettant un va-et-vient d'une seringue à une autre assemblées par un connecteur « plug ».

Six lapins New Zealand White ont été implantés en site épiphyse fémorale distale bilatérale. Un défaut de taille critique a été produit (6 mm de diamètre par 8 mm de profondeur) et rempli soit par du MBCP Gel reconstitué avec la solution iodée ou avec de l'eau stérile comme control. Après comblement, les défauts ont été refermés à l'aide de bouchons coniques pour prévenir une éventuelle fuite du substitut injectable par le reflux sanguin.

Après 6 semaines d'implantation, les explants ont été analysés par microtomographie X (Skyscan) pour une évaluation qualitative et quantitative tridimensionnelle de la repousse osseuse. Les biopsies ont ensuite été préparées pour observation MEB, analyse d'image et coloration histologiques spécifiques.

IV.4.2.3. Résultats

La reconstitution par l'eau stérile ou la solution iodée du MBCP Gel lyophilisé est totale. Le matériau complété par la solution iodée montre des propriétés d'injectabilité supérieures notamment lors de son injection à travers une aiguille. Cette caractéristique est apportée par

les propriétés rhéologiques, particulièrement la viscosité, de la solution iodée. En comparaison, la radiopacité du MBCP Gel/iode est 3 fois supérieure au MBCP Gel (Figure 29). Après 6 semaines d'implantation, la radiopacité apportée par l'iode est encore visible malgré le lavage par les fluides biologiques, s'agissant certainement de granules imprégnés d'iode.

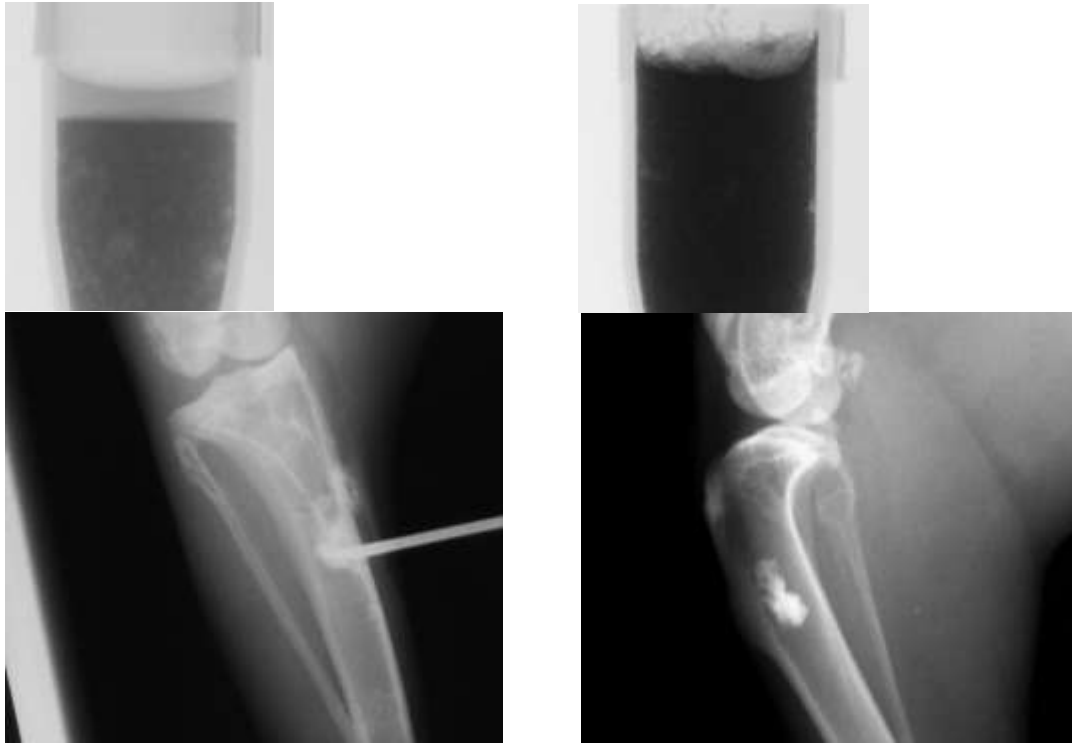


Figure 29 : Radiographies du MBCP Gel reconstitué par de l'eau stérile ou une solution iodée *in vitro* et *in vivo*.

Le MBCP Gel iodé permet la croissance de travées osseuses par phénomène d'ostéoconduction apportée par les granules de BCP. Les observations histologiques et en microscopie électronique nous montre une croissance osseuse à l'intérieur et à la surface des granules. Le taux de repousse osseuse est identique quelque soit le matériau utilisé sans impact de la solution iodée et le tissu osseux (Figure 30).

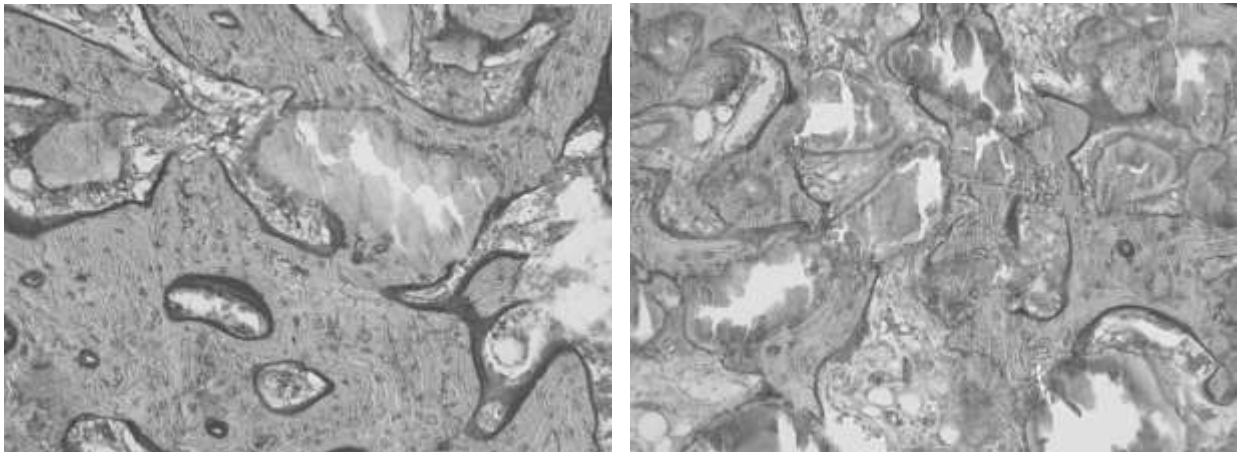


Figure 30 : MBCP Gel iodé vs MBCP Gel. Ostéogénicité à 6 semaines en site osseux chez le lapin.

IV.4.2.4. Conclusion

Les performances du substitut osseux injectable MBCP Gel sont améliorées par reconstitution du polymère sec par une solution à base d'iode. Les propriétés ostéogéniques du matériau iodé ou non sont inchangées. La solution d'iode améliore l'injectabilité et la radiopacité du matériau. Cette étude démontre le potentiel du matériau pour son utilisation en comblement osseux et en chirurgie du rachis par ses caractéristiques d'injectabilité, ostéogénicité et radiopacité. Néanmoins l'utilisation d'iode pose le problème de sensibilité ou de risque d'allergie chez le patient [178] [179]. De plus l'ajout de solutions iodées dans des matériaux injectables comme les ciments phosphocalciques peut compromettre ses propriétés mécaniques.

IV.4.3. Mise au point de granules de phosphate de calcium biphasés intégrant des composés radiopaques.

IV.4.3.1. Introduction

Les granules de céramiques phosphocalciques développés dans ces travaux sont des matériaux adaptés aux substituts osseux injectables. Leur chimie et leur structure apportent les propriétés ostéogéniques et d'injectabilité. Associés à d'autres matériaux facilitant leur injection de type polymères ou leur apportant des propriétés mécaniques supplémentaires de type ciments phosphocalciques, les granules de BCP permettent l'obtention de composites performants et adaptés à la l'indication chirurgicale. Malgré ces performances, les granules de phosphate de calcium n'ont pas ou peu de contraste radiographique lorsqu'ils sont implantés dans le tissu osseux notamment en chirurgie du rachis. Le « granule concept » et le développement croissant de la chirurgie à minima nous ont incités à développer des granules de BCP radiopaques.

IV.4.3.2. Matériels et méthodes

IV.4.3.2.1. Elaboration du phosphate de calcium radiopaque

La radiopacité du phosphate de calcium est obtenue par le mélange de 2 composés sous forme poudre : le phosphate de calcium et un composé radiopaque. Le premier apporte la bioactivité et le second la radiopacité. Nous avons testé 3 composés radiopaques qui sont le sulfate de baryum (Sigma Aldrich), l'oxyde de bismuth et l'oxyde de lutétium (DGTec). Chacun de ces matériaux a été ajouté à la CDA (BCP 6040) en condition humide pour améliorer l'homogénéité de la répartition des 2 composants. Nous avons choisi un ratio massique RO/CDA de 20% qui concorde avec les matériaux du marché [38]. Le matériau est séché et mise en forme pour l'obtention de granules ronds de 80-200 μm . Les granules sont ensuite fritté (1050°C, 5h) et stérilisé par vapeur (les stérilisations par chaleur ou rayonnement sont également possibles).

IV.4.3.2.2. Etude de la cytotoxicité des composés radiopaques utilisés

La cytotoxicité des composés radiopaques a été testée selon la norme ISO 10993-5 déjà décrite. Chacune des poudres été incubé sous agitation contrôlée pendant 72h à 37°C dans du milieu de culture complétement afin de permettre la libération de substances potentiellement cytotoxiques. Le surnageant a ensuite été récupéré après centrifugation (1200 rpm, 20 min) et filtration (0,2 µm) pour éviter la présence de particules et mis en contact d'une lignée ostéoblastique (MC3T3-E1) à 80% de la confluence pendant 24h, 48h et 72h. Nous avons utilisés comme contrôle de mort cellulaire l'actinomycine D à 5 µg/l et le fond des boîtes de culture comme contrôle positif. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test colorimétrique basé sur la mesure de l'activité mitochondriale (test MTS).

IV.4.3.2.3. Caractérisations des granules de phosphate de calcium radiopaques

La température de frittage augmente la réactivité des composés des granules radiopaques et peut induire des changements physico-chimiques comme une intégration partielle des ions baryum, sulfates, bismuth ou lutétium dans la maille cristalline du BCP. Les changements peuvent également être morphologiques avec des modifications de la microstructure. Ces transformations possibles ont été mesurées par diffraction X, spectrométrie infrarouge et microscopie électronique (balayage et transmission).

IV.4.3.2.4. Expérimentation animale

Les implantations animales ont été effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire. Huit rats Lewis de 16 à 18 semaines d'environ 250 g (Charles River) ont été préparés et anesthésiés par inhalation d'une solution d'isoflurane. Des défauts osseux de taille critique (3 mm de diamètre par 5 mm de profondeur) ont été réalisés au niveau des épiphyses fémorales distales. Les cavités ont été comblées par les différents granules radiopaques obtenus. Après 3 semaines d'implantation, les animaux ont été euthanasiés et explantés.

IV.4.3.2.5. Histologie

Les procédures d'histologie sont les mêmes que celles déjà décrites.

IV.4.3.3. Résultats

IV.4.3.3.1. Cytotoxicité

Les éléments radiopaques testés n'ont pas déclenché de réponse cytoyoxique sur la lignée ostéoblastique (se reporter au brevet « Substitut osseux comprenant un agent de contraste, son procédé de préparation et ses utilisation » (PCT/EP2008/064229) [3]).

IV.4.3.3.2. Diffraction X et IRTF

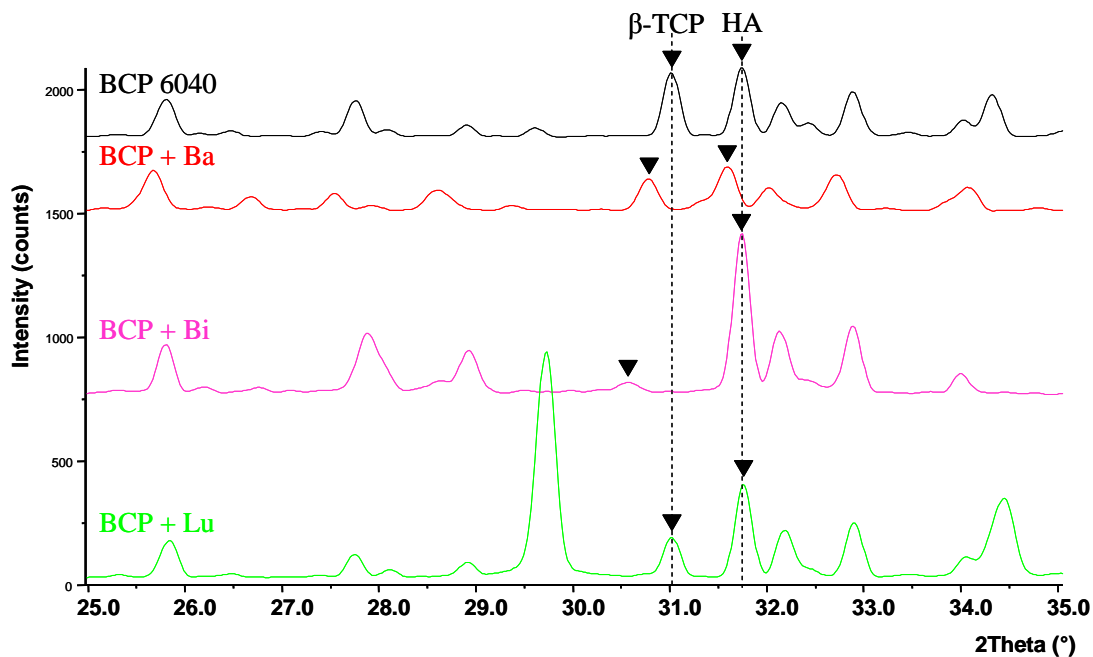


Figure 31 : Diffraction X des différents granules phosphocalciques.

MATERIALS	2θ relative position		Relative peak intensity
	β-TCP	HA	β-TCP / HA
BCP	0°	0°	0.92
BCP 6040 + Ba	-0.238°	-0.134°	0.72
BCP 6040 + Bi	-0.446°	0°	0.07
BCP 6040 + Lu	+0.01°	+0.015°	0.43

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des changements de position des pics HA, β -TCP et des intensités relatives β -TCP/HA en fonction des composés radiopaques ajoutés au BCP.

La diffraction X met en évidence les différentes phases présentes dans les granules radiopaques (HA, β -TCP et composés radiopaques). En comparant la position du pic 100 de l'HA des différents granules, on peut observer des décalages de raies qui varient selon la composition des matériaux (Figure 31). Le tableau 11 nous récapitule le décalage des raies qui indique généralement la possible intégration d'éléments dans la maille cristalline. La raie 100 de l'HA est de $31,74^\circ$ dans le BCP 6040. Dans les granules contenant le sulfate de baryum, cette raie se décale à $31,605^\circ$ impliquant l'intégration possible d'ions dans la maille. Le décalage est nul dans le cas des granules BCP + bismuth et faible pour les granules avec le lutétium. Les décalages de pics interviennent également avec la phase β -TCP dans des proportions nettement plus importantes que dans le cas de l'HA et qui montre une plus grande réactivité de la phase β -TCP.

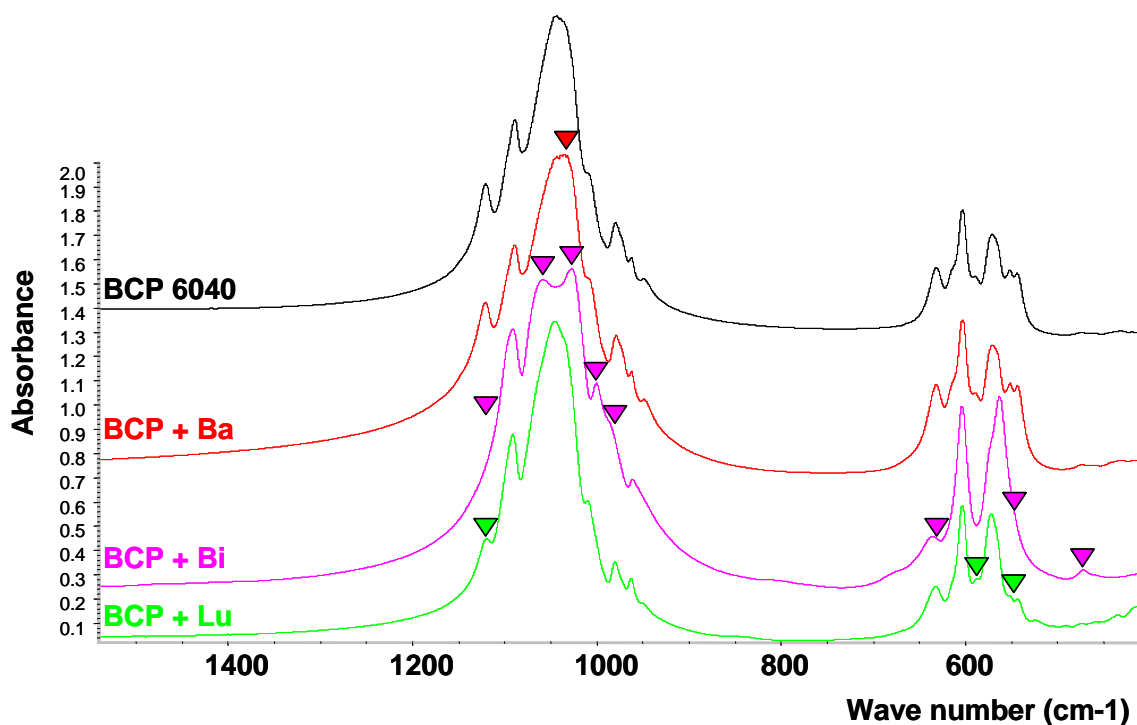


Figure 32 : Spectres infrarouges des groupements phosphates des différents granules phosphocalciques radiopaques.

La spectrométrie infrarouge confirme la présence de phosphate de calcium. On peut observer des déformations des spectres au niveau des groupements phosphates qui confirment la présence d'éléments nouveaux dans l'environnement des groupements phosphates (Figure 32).

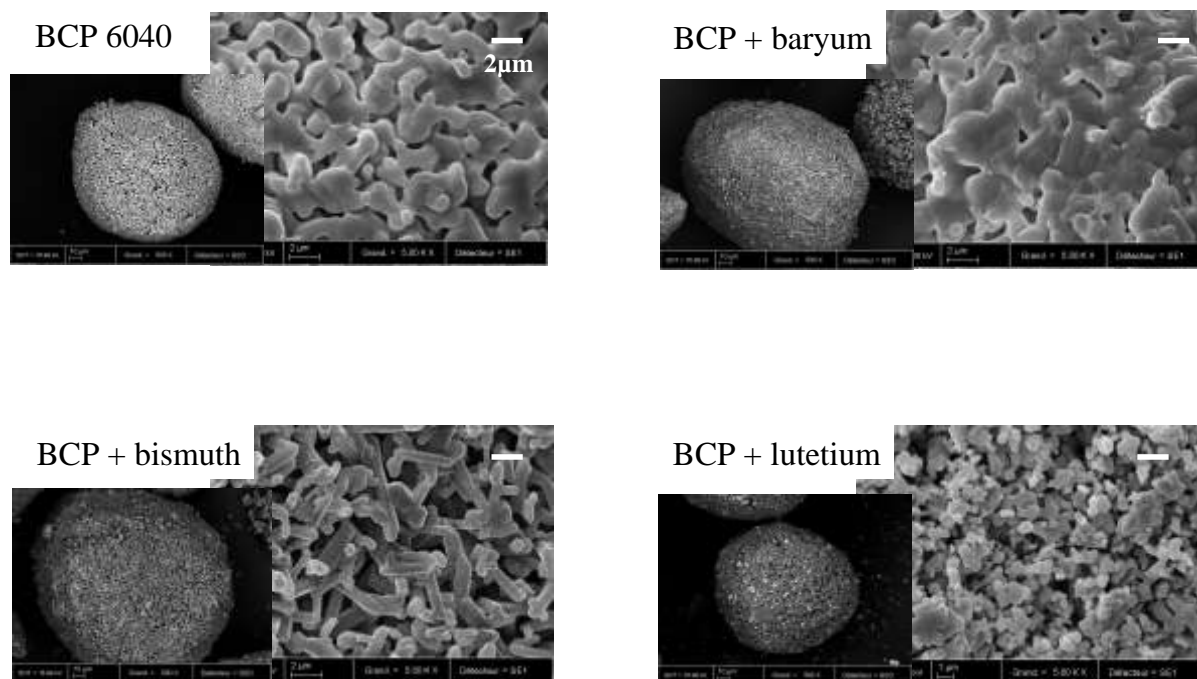


Figure 33 : Observation MEB des différents granules phosphocalciques radiopaques.

L'observation MEB montre des granules de morphologie ronde. A plus fort grossissement, la microstructure (microporosité, forme et taille des cristaux) est différente en fonction de l'élément radiopaque ajouté. Les granules de BCP 6040 sont fortement microporeux avec des cristaux de taille comprise entre 0,5 à 1 μm de diamètre. La présence de sulfate de baryum diminue la microporosité en agissant comme un agent enrobant. L'oxyde de bismuth contribue à la formation de cristaux de BCP sous forme d'aiguille d'environ 1 μm de diamètre pour 4 μm de longueur. Cette morphologie participe à une microporosité importante. Enfin, l'oxyde de lutétium paraît empêcher la croissance des cristaux de BCP. La microscopie électronique à transmission n'apporte pas ou peu d'informations supplémentaires sur la morphologie des cristaux constituant les granules de BCP radiopaques.

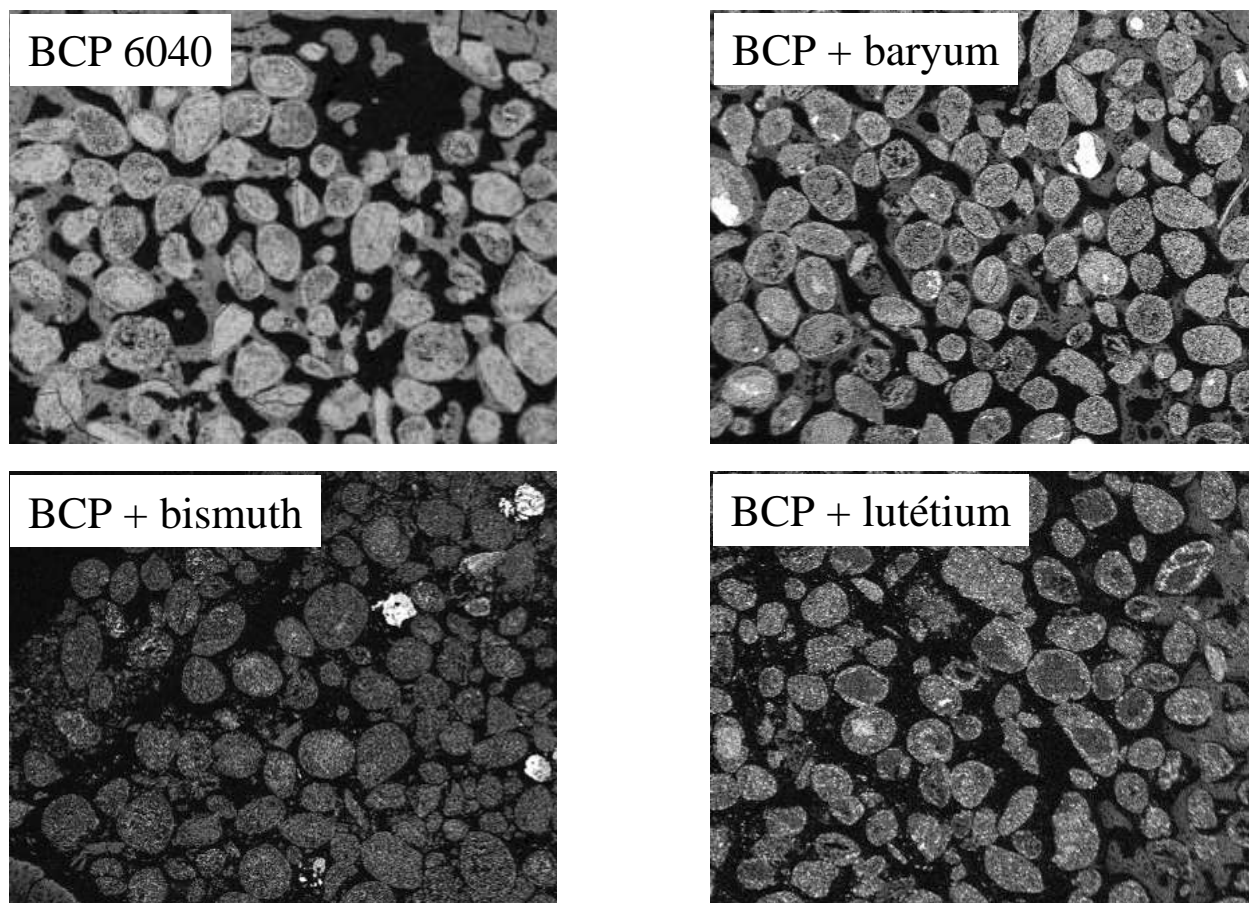


Figure 34: Observation MEB des différents granules BCP radiopaques implantés chez le rat à 3 semaines avant traitement d'images.

La densité de l'os trabéculaire est comprise entre 20 et 30% selon les espèces [180] [181]. La repousse osseuse mesurée sur ces différents implants (N=4) est de 16% avec les granules de BCP, de 15% avec le BCP+Baryum, seulement de 4% avec le BCP+bismuth et enfin de 7% avec les BCP+lutétium.

IV.4.3.3.5. Histologie

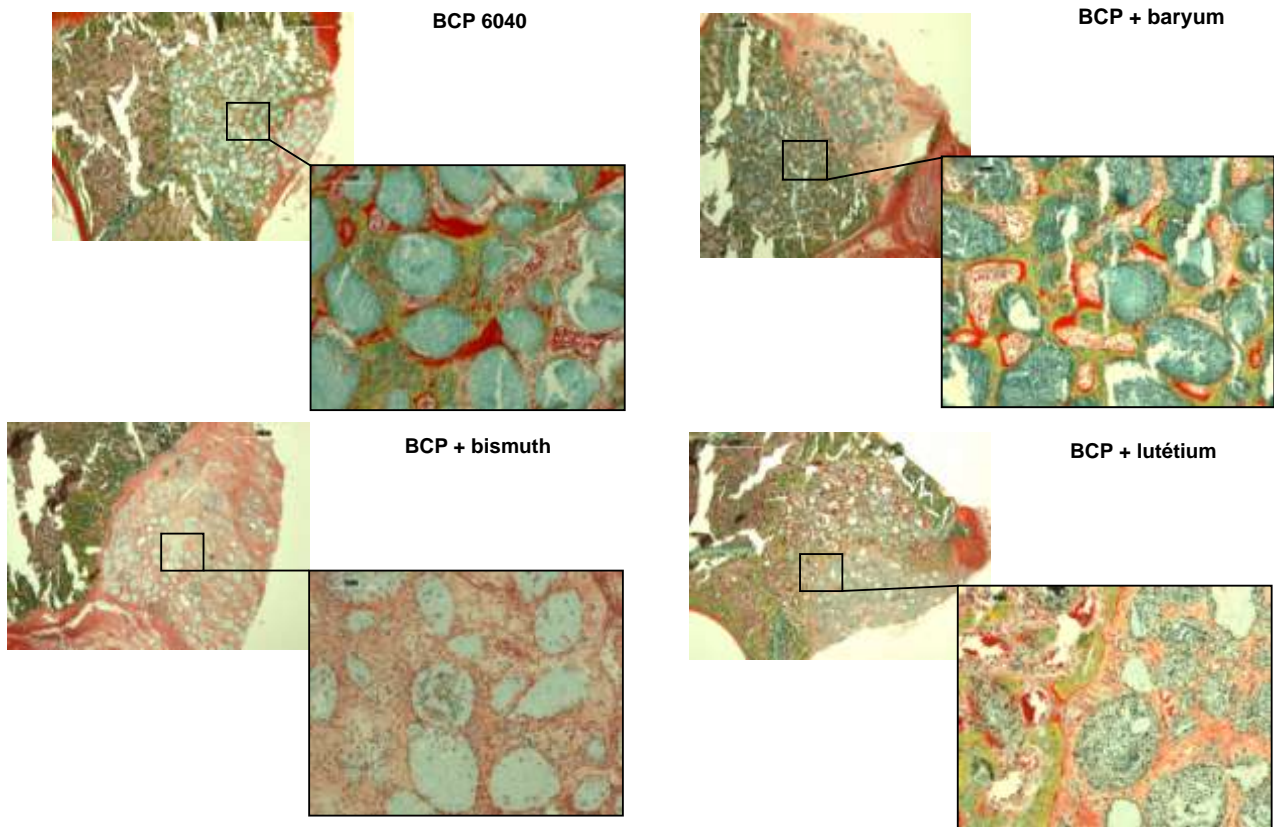


Figure 35 : Coloration au pentachrome de Movat des différents granules après 3 semaines d’implantation en site osseux chez le rat.

La microscopie optique sur coupes histologiques colorées au pentachrome de Movat nous confirme les résultats de la repousse osseuse et les observations MEB des granules implantés. Les granules de BCP et BCP+baryum sont tout deux parfaitement ostéointégrés avec formation d’un tissu osseux minéralisé directement interposé à la surface des granules. La repousse osseuse est retardée avec les granules de BCP+baryum. Aucun tissu osseux ne s’est formé autour des granules de BCP+bismuth. La repousse osseuse est très limitée dans les implants contenant les granules de BCP+lutétium avec une importante dégradation/dissolution du matériau (Figure 35).

IV.4.3.3.6. Radiographies

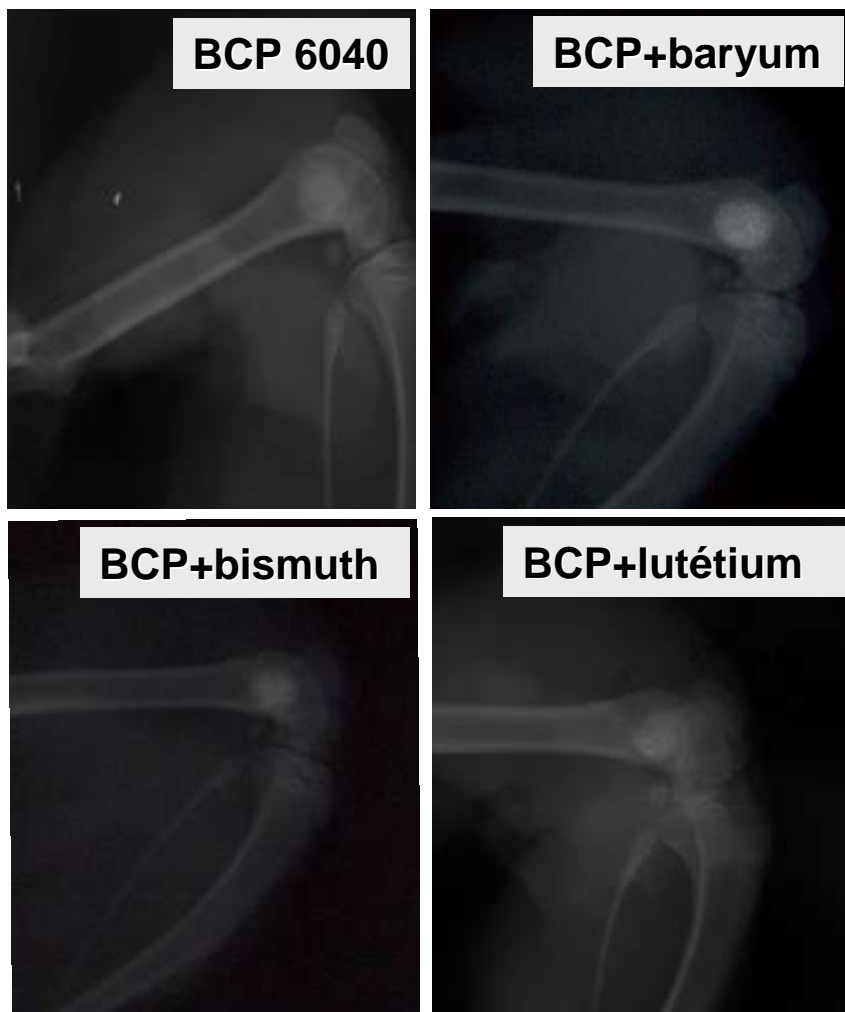


Figure 36: Radiographies des épiphyses fémorales comblées avec les différentes granules BCP radiopaques.

Les radiographies (20 mA, 2 ms) des explants contenant les granules de BCP radiopaques nous montrent la contribution apportée par les différents composants radiopaques comparés au BCP seul. La radiopacité la plus importante est obtenue avec les granules de BCP additionnés de sulfate de baryum qui apporte un net contraste entre le matériau et le tissu osseux (Figure 36).

IV.4.3.4. Conclusion

En conclusion de cette étude, les granules radiopaques testés les plus performants sont ceux constitués de BCP contenant le baryum. Ils permettent une repousse osseuse proche de celle obtenue avec des granules de BCP seuls avec la formation d'un tissu osseux en profondeur de l'implant apporté par ostéoconduction des granules de BCP+baryum. Du point de vue radiographique leur performance est également avérée permettant une discrimination entre le matériau et le tissu osseux. Le comportement de ce matériau (granules 80-200 µm, BCP+baryum) a été testé *in vivo* en association avec différentes matrices : (i) avec le poloxamère précédemment décrit (Pluronic et CitaGel) permettant d'obtenir des résultats similaires aux implants composés du polymère et des granules de BCP seul, ou (ii) associé à un ciment phosphocalcique sans changer les paramètres de prises du ciment ni son injectabilité. Le ciment phosphocalcique contenant les granules de BCP radiopaques a été implanté chez le lapin en site osseux (épiphyses fémorales distales) comparé au ciment sans éléments radiopaques. Les taux de repousse osseuse sont identiques quelque soit l'implant (radiopaque ou non). De plus une analyse toxicologique a été effectuée sur les organes vitaux (foie, cœur, rate, rein, poumon) prouvant que l'ajout de granules de BCP+baryum n'induit pas de réponse cytotoxique systémique. Les performances radiologiques ont été testées sur cadavre humain par injection du ciment phosphocalcique sous amplificateur de brillance en site corps vertébral et prouvent à nouveau que le matériau est suffisamment radiopaque pour une utilisation en chirurgie osseuse à minima du type vertébroplastie ou kyphoplastie.

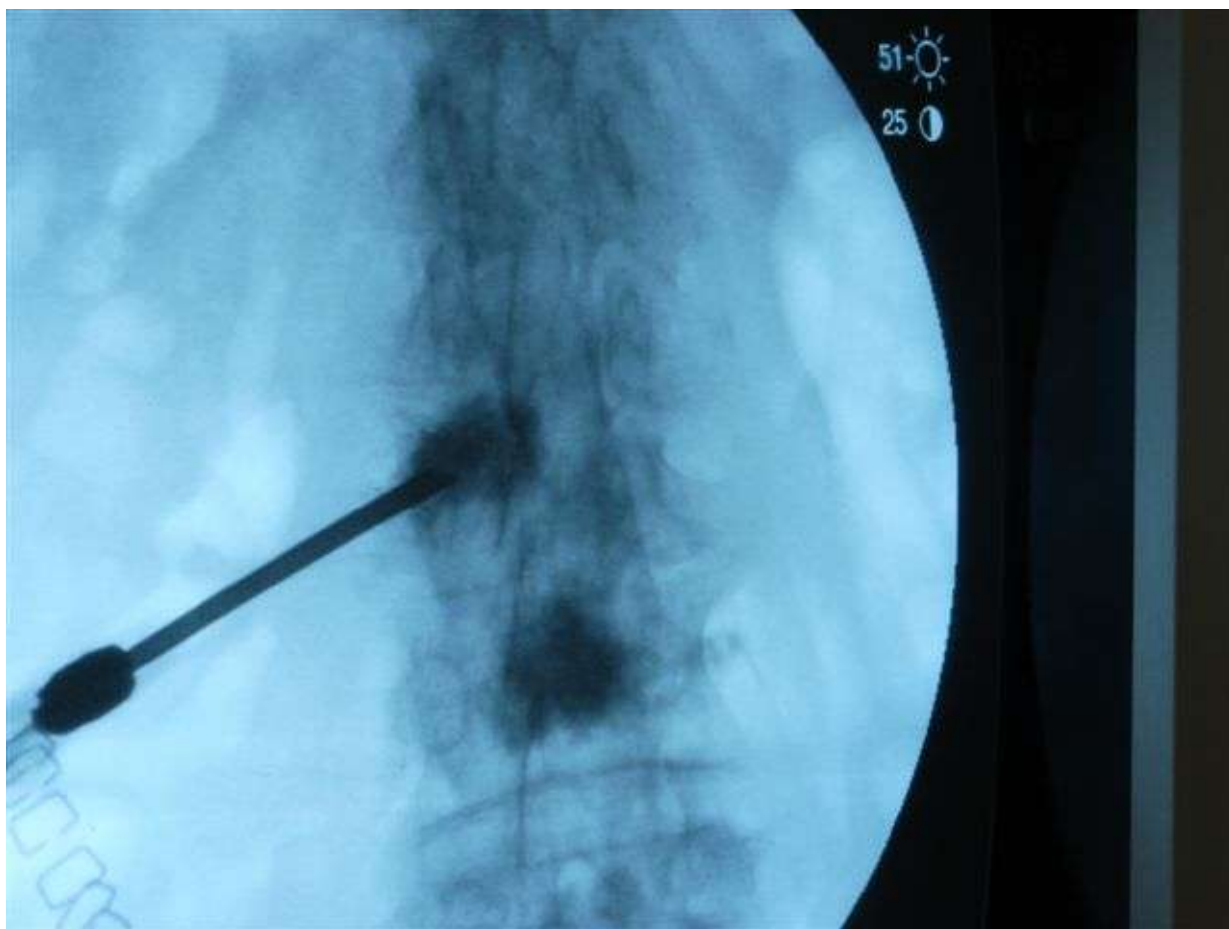


Figure 37 : Radiographie d'un ciment phosphocalcique (MCPC®) rendu radiopaque par ajout de granules radiopaques et implanté en site corps vertébral.

IV.4.3.5. Brevet : « Substitut osseux comprenant un agent de contraste, son procédé de préparation et ses utilisation » (PCT/EP2008/064229)

V. Discussion, perspectives et conclusion

Dans cette partie nous nous intéresserons à discuter des résultats obtenus tout au long de ce travail.

L'essor des nouvelles techniques à minima en chirurgie de réparation osseuse a conduit à la conception de substituts osseux injectables innovants. En plus de l'injectabilité, ces matériaux doivent satisfaire à des exigences spécifiques et dépendantes de l'indication comme leur biodégradabilité, la promotion de la repousse osseuse, des propriétés mécaniques ou de radiopacité adaptées. Les céramiques de phosphate de calcium biphasé sont la base de ces matériaux innovants injectables de par leurs propriétés de bioactivité, et les formes multiples disponibles (blocs, granules, revêtement). Le « granule concept » développé par Daculsi découle de ces spécificités et est devenu une stratégie permettant d'associer plusieurs matériaux favorisant à la fois la repousse osseuse et permettant d'optimiser les propriétés d'injectabilité, de maintien dans le défaut, de contraste ou des propriétés mécaniques. Optimiser ce concept est le thème principal de ce travail.

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser la forme de nos granules de céramique phosphocalciques pour permettre une meilleure injectabilité. L'injectabilité d'un matériau va dépendre de plusieurs paramètres : (i) la force d'injection, (ii) l'écoulement de la poudre (granules de BCP), (iii) les propriétés rhéologiques de la phase continue (polymère, CPC) et (iv) les formes, traitements et dimension de l'ancillaire. La force d'injection appliquée doit être compatible avec la poussée appliquée par la main du praticien qui est généralement comprise entre 40 et 120 N. La rhéologie de la phase vectrice va dépendre de la propriété du matériau la composant (si polymère : nature, concentration, si CPC : temps de prise, granulométrie). Quant aux ancillaires utilisés, ils sont multiples. Il peut s'agir de seringues, classiques ou à bord ouvert, droites ou courbées ou de canules plus ou moins longues. Enfin, l'écoulement de la poudre est amélioré lorsque sa granulométrie est resserrée et que la forme des particules la composant est régulière et de préférence arrondie permettant ainsi un roulement des particules les unes par rapport aux autres empêchant la formation d'agrégats compacts. Des études antérieures ont montré l'efficacité clinique de l'utilisation de granules conventionnels de taille 40-80 μm et 80-200 μm . Notre cahier des charges était donc simple : obtenir et façonner des granules de BCP ronds dans les tailles citées. Deux méthodes

ont été retenues, (i) l'atomisation et (ii) la granulation par fluidisation. Ces méthodes ont rapidement montré leurs limites. En effet, la granulation par fluidisation est adaptée à des matériaux de taille supérieure à 500 μm pour permettre une fluidisation homogène et efficace, la taille des particules de CDA que nous avons utilisée étant de l'ordre du micron nous n'avons pu parvenir à des résultats satisfaisants. Notre expérimentation de granulation par atomisation nous a, quant à elle, permis d'obtenir des granules parfaitement ronds cependant de tailles inférieures à celles recherchées et surtout à des rendements très faibles incompatibles avec les contraintes de production. Les limites de cette technique sont plus contextuelles et dépendantes des caractéristiques de l'appareil utilisé. Les éléments constitutifs et limitant de notre appareil (Buchi B-290) sont : (i) la buse d'atomisation dont le diamètre fixe s'avère trop petit empêchant la formation de gouttelettes suffisamment larges et qui est sujet à obstruction par la matière à sécher et (ii) les dimensions et la configuration de la chambre de séchage qui ne sont pas adaptées à nos besoins de production. Des essais additionnels devront être réalisés sur un appareil d'atomisation dédié à la production. Finalement, le procédé retenu et confidentielle a été développée en interne par la société Biomatlante. Celui-ci est basé sur les propriétés de cohésion de la poudre de CDA permettant l'élaboration de granules ronds dans les tailles choisies, à haut rendement et sans additif (éliminant ainsi les risques de contamination). Ce procédé garanti également la microstructure poreuse de nos granules, essentielle à la bioactivité et à la repousse osseuse. Des essais comparatifs ont d'ailleurs permis de montrer l'amélioration de l'injectabilité d'un matériau comportant des granules ronds comparé au même matériau composé de granules conventionnels (MBCP Gel®) sans pour autant changer les performances de repousse osseuse.

Dans un second temps, nous avons développé et testé différents matériaux injectables et/ou moulables fondés sur les granules de BCP précédemment décrits. Ces matériaux, en fait des suspensions, possèdent des comportements différents en fonction de leur composition. (i) Le premier (Hydros®) est une pâte de céramique issue de la combinaison de différentes classes de particules biphasées et dont la cohésion est assurée par une solution aqueuse. La fraction la plus importante en volume, les nano- micro-particules, forme une matrice qui entourent les particules de plus grande taille. L'ensemble forme une pâte extrudable et moulable qui s'adapte parfaitement au défaut à combler. (ii) Les seconds matériaux (composites NewGel et Citagel) sont constitués de granules de BCP mis en suspension dans des polymères

synthétiques différents qui disposent de propriétés de durcissement (liaisons covalentes ou interactions hydrophobes). Les avantages premiers liés à l'utilisation de ce type de polymère est de pouvoir garantir les espaces inter-grains sans sédimentation et d'obtenir des matériaux qui restent en place dans les défauts. En situation clinique et sur le long terme, les suspensions décrites favorisent la formation osseuse par la bioactivité et l'effet échafaudage apportés par les granules mais sur le court terme, ces mécanismes sont différents. Par exemple, la dégradation de la fraction nano- micro-particules de la pâte de céramique favorise une réaction inflammatoire courte et locale, favorisant le recrutement de facteurs ostéogéniques permettant une repousse osseuse rapide et physiologique. Dans les autres cas, le polymère est dégradé et/ou « lavé » par le couple cellules de dégradation (cellules géantes, macrophages)/fluides et est remplacé par une matrice biologique apportant les facteurs nécessaires à la repousse osseuse. L'efficacité de ces matériaux est avérée mais il faut prendre en compte la densité du matériau ou le taux de réticulation du polymère qui peut ralentir voir diminuer la cicatrisation osseuse. Ce phénomène est d'ailleurs observé avec le composite NewGel dont la réticulation du polymère sa dégradation. Des essais supplémentaires ont été envisagés pour éviter ce phénomène en fractionnant le gel en petits morceaux au moment de l'injection pour permettre une plus grande perméabilité aux fluides et aux cellules. De même, la cicatrisation osseuse au dépend de la pâte de céramique est efficace mais uniquement sur des défauts de petits volumes. Ainsi, les propriétés combinées de ces matériaux pourraient données lieu à de nouveaux substituts « granule concept » composés de nano- micro-particules de céramique en faible densité et réparties de façon homogène dans une matrice polymérique gélifiée et fractionnée. De plus, le polymère NewGel, breveté par la société Biomatlante, est un matériau récent et dont les potentialités n'ont pas encore été toutes testées. Ses propriétés pourraient s'étendre à d'autres applications comme les membranes anti-adhérentes (anti-adhérente d'une face, l'autre face assurant une ostéointégration par intégration de céramiques phosphocalciques ou de facteurs ostéogéniques), les ostéosynthèses/bouchons résorbables pour le maintien de matériaux dans de larges défauts associé à des céramiques phosphocalciques ou en ingénierie tissulaire.

Enfin, nous avons proposé de fonctionnaliser les granules de BCP pour leur utilisation en chirurgie osseuse à minima, spécifiquement pour la vertébroplastie/kyphoplastie, plus largement pour le comblement osseux. Cette optimisation a consisté à améliorer le contraste de granules de BCP tout en conservant leurs propriétés ostéogéniques. Avec le « granule

concept » tout type de matériau peut ainsi être rendu radiopaque en évitant l'inconvénient d'ajouter un élément supplémentaire potentiellement cytotoxique et pouvant gêner la repousse osseuse. Nous avons choisi le mélange solide/solide, d'une céramique de BCP et d'un composé radiopaque. L'avantage de l'invention (brevetée) est de pouvoir contrôler la dispersion du composé radiopaque puisqu'intégré aux granules. Le sulfate de baryum a été choisi pour plusieurs raisons : (i) c'est un matériau connu et utilisé chez l'homme depuis de nombreuses années pour ses propriétés contrastantes et sa faible réactivité, (ii) sa température de fusion est proche de la température de frittage lui permettant de se lier intimement à la céramique et (iii) son coût est faible. Les caractérisations réalisées sur cette céramique de BCP radiopaque ont révélé d'excellentes propriétés d'ostéo-intégration similaire au BCP classique avec toutefois un léger retard de la repousse osseuse. La nouvelle micro-structure de ces BCP radiopaques (microporosité diminuée par le glaçage obtenu en chauffant le sulfate de baryum) explique ce retard par une réduction de la bioactivité. Aucune cytotoxicité locale ni systémique n'a pu être relevé. Une des améliorations futures de cette invention pourrait consister à cloisonner le composé radiopaque dans une matrice phosphocalcique peu résorbable de type hydroxyapatite minimisant ses interactions avec le tissu osseux.

L'ensemble de ce travail soutenu par l'ANR BioRimp et la société Biomatlante a conduit à la commercialisation d'un nouveau substitut osseux injectable, l'Hydros® ainsi que le dépôt de 2 brevets internationaux. La mise au point de nouveaux matériaux injectables a également été rendue possible et qui seront très prochainement mis en valeur dans le cadre de réparations osseuses en chirurgie à minima.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate: Granules concept for Injectable and Mouldable Bone Substitute. *Advances in Science and Technology* 2006;49:9-13.
- [2] Baroth S, Bourges X. Hydrogel et ses applications Bio-Médicales. *International Patent*. 2008;WO/2008/059058.
- [3] Baroth S, Bourges X, Daculsi G. Substitut osseux comprenant un agent de contraste, son procédé de préparation et ses utilisations. *International Patent*. 2008;PCT/EP2008/064229.
- [4] Weiner LA, H. Daniel Wagner. *Materials design in biology*. *Mater sci eng C*. 2000;11:1-8.
- [5] Banks W. *Supportive Tissues_Bone*. *Applied Veterinary Histology*. 1993;3rd Edition:107-26.
- [6] Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Dec 30;228(1-2):79-102.
- [7] Barrère F, Mahmood T, De Groot K, van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Material Science and Engineering*. 2008;R59:38-71.
- [8] Hodges R. *Bone Structure. The Histology of the Fowl*. 1974:273-94.
- [9] Baron R. Importance of intermediate phases between resorption and formation in the measurement and understanding of the bone remodeling sequence. *Bone Histomorphometry*. 1976.
- [10] Bauer TW, Togawa D. Bone graft substitutes: towards a more perfect union. *Orthopedics*. 2003 Sep;26(9):925-6.
- [11] Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 2000 Jul;31(3):389-98.
- [12] Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Mar(360):71-86.
- [13] Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999 Oct;30(4):571-81.
- [14] Bruck SD. Materials or biomaterials? *Int J Artif Organs*. 1990 Aug;13(8):469-71.
- [15] Williams D. *Definitions in Biomaterials. Second Consensus Meeting, Eur Soc Biomat, Chester, UK, Ed Elsevier Septembre 1991*. 1991.

BIBLIOGRAPHIE

- [16] Désévaux C. Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutique Montréal: Université de Montréal. 2002.
- [17] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53.
- [18] Breme H, Biehl V, Helsen J. Metals and Implants. *Metals as Biomaterials*. 1998:37-71.
- [19] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Aug(329):300-9.
- [20] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
- [21] Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br*. 1999 Mar;81(2):333-5.
- [22] Schmalzried TP. The posterior stabilized total knee prosthesis. Assessment of polyethylene damage and osteolysis after a ten-year-minimum follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 1996 Sep;78(9):1446-7.
- [23] Young AM, Sychterz CJ, Hopper RH, Jr., Engh CA. Effect of acetabular modularity on polyethylene wear and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Jan;84-A(1):58-63.
- [24] Chaplin RP, Lee AJ, Hooper RM, Clarke M. The mechanical properties of recovered PMMA bone cement: a preliminary study. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Dec;17(12):1433-48.
- [25] Percutaneous vertebroplasty or kyphoplasty for vertebral fractures caused by osteoporosis or malignancy. *Technol Eval Cent Asses Program Exec Summ*. 2008 Sep;23(5):1-3.
- [26] Eppley BL, Sadove AM, Havlik RJ. Resorbable plate fixation in pediatric craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Jul;100(1):1-7; discussion 8-13.
- [27] Zhang P, Hong Z, Yu T, Chen X, Jing X. In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(l-lactide). *Biomaterials*. 2008 Oct 4.
- [28] Link DP, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Cuijpers VM, Wolke JG, Mikos AG, et al. Evaluation of the biocompatibility of calcium phosphate cement/PLGA microparticle composites. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Dec 1;87(3):760-9.
- [29] Allain J. Interbody fusion of the lumbar spine under mini-invasive technique (with videoscopic control). *Académie Nationale de Chirurgie*. 2004;3 (4):24-33.

BIBLIOGRAPHIE

- [30] Johnell O. Economic implication of osteoporotic spine disease: cost to society. *Eur Spine J.* 2003 Oct;12 Suppl 2:S168-9.
- [31] Kado DM, Browner WS, Palermo L, Nevitt MC, Genant HK, Cummings SR. Vertebral fractures and mortality in older women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med.* 1999 Jun 14;159(11):1215-20.
- [32] Grigoryan M, Guermazi A, Roemer FW, Delmas PD, Genant HK. Recognizing and reporting osteoporotic vertebral fractures. *Eur Spine J.* 2003 Oct;12 Suppl 2:S104-12.
- [33] Gauthier O, Khairoun I, Bosco J, Obadia L, Bourges X, Rau C, et al. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Jul 1;66(1):47-54.
- [34] Galibert P, Deramond H, Rosat P, Le Gars D. [Preliminary note on the treatment of vertebral angioma by percutaneous acrylic vertebroplasty]. *Neurochirurgie.* 1987;33(2):166-8.
- [35] Provenzano MJ, Murphy KP, Riley LH, 3rd. Bone cements: review of their physiochemical and biochemical properties in percutaneous vertebroplasty. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004 Aug;25(7):1286-90.
- [36] Lewis G. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: state-of-the-art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Feb;76(2):456-68.
- [37] Charnley J. The Bonding of Prostheses to Bone by Cement. *J Bone Joint Surg Br.* 1964 Aug;46:518-29.
- [38] Lieberman IH, Togawa D, Kayanja MM. Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine J.* 2005 Nov-Dec;5(6 Suppl):305S-16S.
- [39] Kallmes DF, Jensen ME. Percutaneous vertebroplasty. *Radiology.* 2003 Oct;229(1):27-36.
- [40] Dreesmann H. Ueber knochenplombierung. *Bieter Klin Chir.* 1892;9:804-10.
- [41] Peltier LF. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Clin Orthop.* 1961;21:1-31.
- [42] Turner TM, Urban RM, Gitelis S, Haggard WO, Richelsoph K. Resorption evaluation of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect. *Orthopedics.* 2003 May;26(5 Suppl):s577-9.
- [43] Kelly CM, Wilkins RM. Treatment of benign bone lesions with an injectable calcium sulfate-based bone graft substitute. *Orthopedics.* 2004 Jan;27(1 Suppl):s131-5.
- [44] Carroll M, Lewis G, Xu J, Moseley J, Cole J, Haggard W. Evaluation of a synthetic bone defect test model to aid in the selection of materials for use in vertebral body compression fracture repair. *Orthopedics.* 2004 Jan;27(1 Suppl):s119-22.

BIBLIOGRAPHIE

- [45] Driessens FCM, Planell JA, Gil FJ. Calcium Phosphate Bone Cements. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD, Schwartz ER, editors. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part B: Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 855-77.
- [46] Ishikawa K, Asaoka K. Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995;29(12):1537-43.
- [47] Bohner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal*. 2001;10:S114-S21.
- [48] Khairoun I, Magne D, Gauthier O, Bouler J-M, Aguado E, Daculsi G, et al. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of carbonated apatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;60:633-42.
- [49] Passuti N, Gouin F. Antibiotic-loaded bone cement in orthopedic surgery. *Joint Bone Spine*. 2003 Jun;70(3):169-74.
- [50] Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000 Dec;31 Suppl 4:37-47.
- [51] Li YW, Leong JC, Lu WW, Luk KD, Cheung KM, Chiu KY, et al. A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study. *J Biomed Mater Res*. 2000 Oct;52(1):164-70.
- [52] Ikenaga M, Hardouin P, Lemaitre J, Andrianjatovo H, Flautre B. Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1998 Apr;40(1):139-44.
- [53] Frankenburg EP, Goldstein SA, Bauer TW, Harris SA, Poser RD. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Aug;80(8):1112-24.
- [54] Belkoff SM, Mathis JM, Erbe EM, Fenton DC. Biomechanical evaluation of a new bone cement for use in vertebroplasty. *Spine*. 2000 May 1;25(9):1061-4.
- [55] Fujita H, Ido K, Matsuda Y, Iida H, Oka M, Kitamura Y, et al. Evaluation of bioactive bone cement in canine total hip arthroplasty. *J Biomed Mater Res*. 2000 Feb;49(2):273-88.
- [56] Yamamuro T, Nakamura T, Iida H, Kawanabe K, Matsuda Y, Ido K, et al. Development of bioactive bone cement and its clinical applications. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(16):1479-82.
- [57] Gauthier O, Goyenvallée E, Bouler JM, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, 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 Mater Med.* 2001 May;12(5):385-90.

[58] Gauthier O, Boix D, Grimandi G, Aguado E, Bouler JM, Weiss P, et al. A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs. *J Periodontol.* 1999 Apr;70(4):375-83.

[59] Weiss P, Obadia L, Magne D, Bourges X, Rau C, Weitkamp T, et al. Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(25):4591-601.

[60] Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):59S-61S.

[61] Lapkowski M, Weiss P, Daculsi G, Dupraz A. Composition pour Bio-Matériau, Procédé de préparation. International Patent. 1997;WO 97/05911.

[62] Turczyn R, Weiss P, Lapkowski M, Daculsi G. In situ self hardening bioactive composite for bone and dental surgery. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2000;11(2):217-23.

[63] Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci.* 2002 Dec 2;99(3):215-28.

[64] Fellah BH, Weiss P, Gauthier O, Rouillon T, Pilet P, Daculsi G, et al. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *J Orthop Res.* 2006 Apr;24(4):628-35.

[65] Le Nihouannen D, Saffarzadeh A, Aguado E, Goyenvalle E, Gauthier O, Moreau F, et al. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Feb;18(2):225-35.

[66] Le Guehenec L, Goyenvalle E, Aguado E, Pilet P, Bagot D'Arc M, Bilban M, et al. MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Jan;16(1):29-35.

[67] Le Guehenec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater.* 2004;8:1-10; discussion -1.

[68] Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002 Sep 2;41(17):3130-46.

BIBLIOGRAPHIE

- [69] Daculsi G, Bouler JM, LeGeros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int Rev Cytol.* 1997;172:129-91.
- [70] Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Mar;14(3):195-200.
- [71] Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001 Jun;71(6):354-61.
- [72] Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jul;46(1):103-11.
- [73] LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater.* 1993;14(1):65-88.
- [74] Kurioka K, Umeda M, Teranobu O, Komori T. Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Sci.* 1999 Aug;45(3-4):149-63.
- [75] Bohner M, Lemaire J, Ring TA. Kinetics of Dissolution of beta-Tricalcium Phosphate. *J Colloid Interface Sci.* 1997 Jun 1;190(1):37-48.
- [76] Pratt JN, Griffon DJ, Dunlop DG, Smith N, Howie CR. Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroxyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects. *Biomaterials.* 2002 Aug;23(16):3309-17.
- [77] Daculsi G, Passuti N, Martin S, Le Nihouannen JC, Brulliard V, Delectrin J, 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 Appar Mot.* 1989;75(2):65-71.
- [78] Basle MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delectrin J, Daculsi G, et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif Tissue Int.* 1993 Nov;53(5):348-56.
- [79] Passuti N, Daculsi G, Rogez JM, Martin S, Bainvel JV. Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Nov(248):169-76.
- [80] Daculsi G, Bagot d'Arc M, Corlieu P, Gersdorff M. Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992 Aug;101(8):669-74.

BIBLIOGRAPHIE

- [81] Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(16):1473-8.
- [82] Heughebaert M, LeGeros RZ, Gineste M, Guilhem A, Bonel G. Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J Biomed Mater Res*. 1988 Dec;22(3 Suppl):257-68.
- [83] Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*. 1989;23(8):883-94.
- [84] Daculsi G, LeGeros RZ, Mitre D. Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcif Tissue Int*. 1989 Aug;45(2):95-103.
- [85] Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int*. 1990;46(1):20-7.
- [86] De Groot K. *Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties*. Boca Raton CRC Press, bioceramics of calcium phosphate. 1983:100-14.
- [87] Hench L, Splinter R, Allen W, Greelee T. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1971;2:117-41.
- [88] Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials*. 1984 Jan;5(1):5-10.
- [89] Ducheyne P, Cuckler JM. Bioactive ceramic prosthetic coatings. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 Mar(276):102-14.
- [90] Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2287-303.
- [91] Li X, van Blitterswijk CA, Feng Q, Cui F, Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials*. 2008 Aug;29(23):3306-16.
- [92] Andrade JD, Hlady V. Plasma protein adsorption: the big twelve. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;516:158-72.
- [93] Norde W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv Colloid Interface Sci*. 1986 Sep;25(4):267-340.
- [94] Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2311-21.
- [95] Bender SA, Bumgardner JD, Roach, Bessho K, Ong JL. Effect of protein on the dissolution of HA coatings. *Biomaterials*. 2000 Feb;21(3):299-305.
- [96] Fan H, Qu S, Zhang X. The precipitation of bone-like apatite on the surface of calcium phosphate: The effect of bovine serum albumin. *Bioceramics*. 2000:163-6.

BIBLIOGRAPHIE

- [97] Dee K, Puleo D, Bizios R. Protein-surface interactions. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. 2002:37-52.
- [98] Haynes C, Norde W, 517–566. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloid Surf B* 1994:517-66.
- [99] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Feb(395):4-10.
- [100] Suzuki T, Yamamoto T, Toriyama M, Nishizawa K, Yokogawa Y, Mucalo MR, et al. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells. *J Biomed Mater Res*. 1997 Mar 15;34(4):507-17.
- [101] Nishizawa K, Toriyama M, Suzuki T, Kawamoto Y, Yokogawa Y. Effects of the surface wettability and zeta potential of bioceramics on the adhesiveness of anchorage-dependent animal cells. *J Ferment Bio-eng*. 1993;75:435-7.
- [102] Nishizawa K, Toriyama M, Suzuki T, Kawamoto Y, Yokogawa Y, Nagata F. Surface modification of calcium phosphate ceramics with silane coupling reagents. *Nihon Kagaku Kaishi*. 1995:63-7.
- [103] Suzuki T, Toriyama M, Kawamoto Y, Yokogawa Y, Kawamura S. The adhesiveness and growth of anchorage-dependent animal cells on biocompatible ceramic culture carriers. *J Ferment Bio-eng*. 1991;72:450-6.
- [104] Toriyama M, Kawamoto Y, Suzuki T, Yokogawa Y, Nishizawa K, Nagata F. Wettability of calcium phosphate ceramics by water. *J Ceram Soc Jpn*. 1995;103:46-9.
- [105] Lasserre A, Bajpai PK. Ceramic drug-delivery devices. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1998;15(1):1-56.
- [106] Buchholz HW, Elson RA, Heinert K. Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clin Orthop Relat Res*. 1984 Nov(190):96-108.
- [107] Morris L, Bajpai PK. Development of a resorbable tricalcium phosphate amine antibiotic composite. *Proc Mat Res Soc Symp*. 1989;110:293-300.
- [108] Lind M, Overgaard S, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C, Soballe K. Transforming growth factor-beta stimulates bone ongrowth. Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs. *Acta Orthop Scand*. 1996 Dec;67(6):611-6.
- [109] Lind M, Overgaard S, Soballe K, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C. Transforming growth factor-beta 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs. *J Orthop Res*. 1996 May;14(3):343-50.

BIBLIOGRAPHIE

- [110] Smucker JD, Bobst JA, Petersen EB, Nepola JV, Fredericks DC. B2A peptide on ceramic granules enhance posterolateral spinal fusion in rabbits compared with autograft. *Spine*. 2008 May 20;33(12):1324-9.
- [111] Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008 Sep;83(9):1032-45.
- [112] Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E, Katagiri Y. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J Biomed Mater Res*. 1998 Mar 15;39(4):536-8.
- [113] Chang P. Polymer implant materials with improved X-ray opacity and biocompatibility. *Biomaterials*. 1981 Jul;2(3):151-5.
- [114] Ginebra MP, Albuixech L, Fernandez-Barragan E, Aparicio C, Gil FJ, San RJ, et al. Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents. *Biomaterials*. 2002;23(8):1873-82.
- [115] Pittet C. Developement and characterization of injectable calcium phosphate cements for use in vertebroplasty. Thèse de doctorat en Sciences des matériaux Lausanne : Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. 2001.
- [116] Wang X, Ye J, Wang Y. Influence of a novel radiopacifier on the properties of an injectable calcium phosphate cement. *Acta Biomater*. 2007 Sep;3(5):757-63.
- [117] Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA. Radio-opaque agents in bone cement increase bone resorption. *J Bone Joint Surg Br*. 1997 Jan;79(1):129-34.
- [118] Acarturk O, Lehmicke M, Aberman H, Toms D, Hollinger JO, Fulmer M. Bone healing response to an injectable calcium phosphate cement with enhanced radiopacity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Jul;86(1):56-62.
- [119] Baroth S, Bourges X, Daculsi G, Fellah B. Radiopaque Strategy for Bone Injectable Substitute. *Key Engineering Materials*. 2007;20(1):39-42.
- [120] Daculsi G, Aguado E, Corre P, Bourges X, Baroth S, Goyenvalle E. Improvement of Radio Opacity of Injectable Bone Substitute MBCP Gel™ for Minimal Invasive Surgery MIS. *Key Engineering Materials*. 2007;Vols. 361-363 (2008) 1277-80.
- [121] Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am*. 2001 Feb;83-A(2):201-11.
- [122] Shida J, Trindade MC, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2000 Aug;67(2):151-5.

BIBLIOGRAPHIE

- [123] Lohmann CH, Dean DD, Bonewald LF, Schwartz Z, Boyan BD. Nitric oxide and prostaglandin E2 production in response to ultra-high molecular weight polyethylene particles depends on osteoblast maturation state. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Mar;84-A(3):411-9.
- [124] Pioletti DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kwon SY, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials.* 2000 Jun;21(11):1103-14.
- [125] Jacobs JJ, Shanbhag A, Glant TT, Black J, Galante JO. Wear Debris in Total Joint Replacements. *J Am Acad Orthop Surg.* 1994 Jul;2(4):212-20.
- [126] Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Jun;75(6):863-79.
- [127] Glant TT, Jacobs JJ, Mikecz K, Yao J, Chubinskaja S, Williams JM, et al. Particulate-Induced, Prostaglandin- and Cytokine-Mediated Bone Resorption in an Experimental System and in Failed Joint Replacements. *Am J Ther.* 1996 Jan;3(1):27-41.
- [128] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. *Biomaterials.* 2005 May;26(15):2361-9.
- [129] Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Aguado E, Daculsi G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):71S-4S.
- [130] Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res.* 2005 Sep;23(5):1013-21.
- [131] Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 Apr;35(3):232-42.
- [132] Medina Ledo H, Thackray AC, Jones IP, Marquis PM, Macaskie LE, Sammons RL. Microstructure and composition of biosynthetically synthesised hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Nov;19(11):3419-27.
- [133] Boix D, Gauthier O, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Grimandi G, et al. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2004 May;75(5):663-71.

BIBLIOGRAPHIE

- [134] Gautier H, Guicheux J, Grimandi G, Faivre-Chauvet A, Daculsi G, Merle C. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. *J Biomed Mater Res*. 1998 Jun 15;40(4):606-13.
- [135] Yohay DA, Zhang J, Thrailkill KM, Arthur JM, Quarles LD. Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Physiol*. 1994 Mar;158(3):467-75.
- [136] Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995 Feb 13;179(1):95-103.
- [137] Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, et al. Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res*. 2003 Aug;18(8):1430-42.
- [138] Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(9):1177-88.
- [139] Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*. 2003 Nov;18(11):2060-8.
- [140] Bajpai PK, Benghuzzi HA. Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and biologicals. *J Biomed Mater Res*. 1988 Dec;22(12):1245-66.
- [141] Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg Br*. 1992 Jul;74(4):600-4.
- [142] Trecant M, Guicheux J, Grimandi G, Leroy M, Daculsi G. Dynamic compaction: a new process to compact therapeutic agent-loaded calcium phosphates. *Biomaterials*. 1997 Jan;18(2):141-5.
- [143] Le Guehenec L, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jan 15;72(1):69-78.
- [144] Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, et al. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Jul(364):231-9.

BIBLIOGRAPHIE

- [145] Helfrich MH, Thesingh CW, Mieremet RH, van Iperen-van Gent AS. Osteoclast generation from human fetal bone marrow in cocultures with murine fetal long bones. A model for in vitro study of human osteoclast formation and function. *Cell Tissue Res.* 1987 Jul;249(1):125-36.
- [146] Mangashetti LS, Khapli SM, Wani MR. IL-4 inhibits bone-resorbing activity of mature osteoclasts by affecting NF-kappa B and Ca²⁺ signaling. *J Immunol.* 2005 Jul 15;175(2):917-25.
- [147] Khairoun I, Magne D, Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, et al. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jun 15;60(4):633-42.
- [148] Weiss P, Gauthier O, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):67S-70S.
- [149] Bouchard A, Jovanovic N, de Boer AH, Martin A, Jiskoot W, Crommelin DJ, et al. Effect of the spraying conditions and nozzle design on the shape and size distribution of particles obtained with supercritical fluid drying. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Sep;70(1):389-401.
- [150] Chew NY, Chan HK. Influence of particle size, air flow, and inhaler device on the dispersion of mannitol powders as aerosols. *Pharm Res.* 1999 Jul;16(7):1098-103.
- [151] Lukasiewicz SJ. Spray-Drying Ceramic Powders. *Journal of American Ceramic Society.* 1989;72(4):617-24.
- [152] Gouin F, Delecrin J, Passuti N, Touchais S, Poirier P, Bainvel JV. [Filling of bone defects using biphasic macroporous calcium phosphate ceramic. Apropos of 23 cases]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1995;81(1):59-65.
- [153] LeGeros RZ, Lin S, Rohanzadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(3):201-9.
- [154] Daculsi G, Legeros RZ, Grimandi G, Soueidan A, Aguado E, Goyenvalle E, et al. Effect of sintering of HA/TCP bioceramics on microstructure, dissolution, cell proliferation and bone ingrowth. *Bioceramics* 20. 2007.
- [155] Ducheyne P, Radin S, King L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):25-34.
- [156] Radin SR, Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):35-45.

BIBLIOGRAPHIE

- [157] Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials*. 1997 Sep;18(17):1185-90.
- [158] Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):944-53.
- [159] Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Feb;18(2):287-94.
- [160] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, Gauthier O, Delplace S, Pilet P, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone*. 2005;36(6):1086-93.
- [161] LeGeros RZ, Chohayeb A, Shulman A. Apatitic calcium phosphate: possible restorative materials. *J Dent Res* 1982;61:343.
- [162] Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 1983;62:672.
- [163] Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Oct-Nov;10(10/11):663-70.
- [164] Hing KA, Best SM, Bonfield W. Characterization of porous hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 1999 Mar;10(3):135-45.
- [165] Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng*. 2001 Jan 5;72(1):96-107.
- [166] Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2003 Jul;24(16):2739-47.
- [167] Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol Histopathol*. 1999 Jul;14(3):871-7.
- [168] Iqbal J, Sun L, Kumar TR, Blair HC, Zaidi M. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14925-30.
- [169] Nakashima Y. Stimulatory effects of ceramic particles on the production of bone resorbing mediators. *Bioceramics* 1994;7:305-9.

BIBLIOGRAPHIE

- [170] Curran JM, Gallagher JA, Hunt JA. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(26):5313-20.
- [171] Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 1997 Dec 5;37(3):324-34.
- [172] Colombier ML, Lesclous P, Tulasne JF. [Bone graft healing]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2005 Jun;106(3):157-65.
- [173] Baroth S, Uzel PA, Bourgeois N, Le Francois T, Rouvillain JL, Bourges X, et al. Nouveau composite associant un hydrogel thermosensible à des granules de phosphate de calcium biphasé: étude *in vivo* chez le lapin. 25èmes Journées Scientifiques du Collège Français de Biomatériaux Dentaires (cfbd). 2008.
- [174] Taylor RS, Fritzell P, Taylor RJ. Balloon kyphoplasty in the management of vertebral compression fractures: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur Spine J*. 2007 Aug;16(8):1085-100.
- [175] Chiras J, Barragan-Campos HM, Cormier E, Jean B, Rose M, LeJean L. [Vertebroplasty: state of the art]. *J Radiol*. 2007 Sep;88(9 Pt 2):1255-60.
- [176] Verlaan JJ, Oner FC, Dhert WJ. Anterior spinal column augmentation with injectable bone cements. *Biomaterials*. 2006 Jan;27(3):290-301.
- [177] Daculsi G, Mousselard H, Goyenvallée E, Pilet P, Delplace S, Aguado E. Minimal invasive surgery in spine, new development of injectable ceramic MBCP for vertebral body bone filling: *in vivo* experiment. *key Engineering Materials*. 2005;284-286:803-6.
- [178] Singh J, Daftary A. Iodinated contrast media and their adverse reactions. *J Nucl Med Technol*. 2008 Jun;36(2):69-74; quiz 6-7.
- [179] Beaty AD, Lieberman PL, Slavin RG. Seafood allergy and radiocontrast media: are physicians propagating a myth? *Am J Med*. 2008 Feb;121(2):158 e1-4.
- [180] Glorieux FH, Travers R, Taylor A, Bowen JR, Rauch F, Norman M, et al. Normative data for iliac bone histomorphometry in growing children. *Bone*. 2000 Feb;26(2):103-9.
- [181] Teo JC, Si-Hoe KM, Keh JE, Teoh SH. Relationship between CT intensity, micro-architecture and mechanical properties of porcine vertebral cancellous bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2006 Mar;21(3):235-44.

LISTE DES FIGURES

Figure 9 : Structure d'un os long.....p9

Figure 10 : Schématisation des éléments constitutifs du tissu osseux.....p11

Figure 11 : Schéma du remaniement osseux. Le couplage entre la phase de résorption ostéoclasique et la phase de formation ostéoblastique permet un équilibre entre la quantité d'os résorbé et d'os formé.....p12

Figure 12 : Les étapes principales de la cicatrisation osseuse.....p13

Figure 13 : Cliché en transmission électronique d'un phosphate de calcium (BCP 6040) implanté dans l'épiphyse fémorale distale d'un rat après 6 semaines.....p42

Figure 14 : Modèle et théorie du potentiel zeta.....p43

Figure 15 : Granules ronds de BCP 6040 implantés 3 semaines dans un fémur de rat. Coloration au pentachrome de Movat. Bleu : matériau CaP, rouge : ostéoïde, vert/jaune : tissu osseux minéralisé et rose/rouge : moelle osseuse.....p49

Figure 16 : Reconstruction 3D et 2D d'une épiphyse fémorale de lapin implantée 6 semaines avec un matériau phosphocalcique.....p51

Figure 9 : Schéma d'un « spray drier » du type Buchi B290.....p54

Figure 10 : Granules ronds de CDA obtenus par atomisation.....p56

Figure 11 : Schéma de fonctionnement d'un granulateur par turbulence et lit fluidisé.....p57

Figure 12 : Diffractogrammes de céramiques phosphocalciques biphasées l'une avec un rapport HA/ β -TCP de 60/40 (en haut) et l'autre de 20/80 (en bas).....p59

Figure 13 : Spectre d'un phosphate de calcium biphasé (BCP 6040).....p60

Liste des figures

Figure 14 : Observations MEB de granules ronds de BCP à différents grandissement.....	p60
Figure 15 : Préparation et dimension du modèle d'os trabéculaire bovin.....	p70
Figure 16 : Banc de compression (MTS Renew).....	p70
Figure 17 : Remplissage et compression d'un ballonnet de kyphoplastie rempli du composite NewGel.....	p71
Figure 18 : Fractures induites par compression uniaxiale de carottes calibrées d'os trabéculaire bovin.....	p73
Figure 19 : Rupture en compression du modèle d'os trabéculaire bovin. Comparaison du modèle plein versus vide et rempli du composite NewGel.....	p73
Figure 20 : Coloration HES du composite NewGel à 6 semaines d'implantation en site osseux chez le lapin. La colonisation des cellules géantes de résorption est intense.....	p75
Figure 21 : Coloration MOVAT du composite NewGel à 6 semaines d'implantation en site osseux chez le lapin. L'ostéoconduction est supportée par les granules de BCP.....	p76
Figure 22 : Observation MEB du matériau implanté dans l'épiphyse fémorale de lapin à faible et fort grandissement.....	p76
Figure 23 : Coloration MOVAT du composite NewGel à 6 mois d'implantation en site osseux chez la chèvre.....	p77
Figure 24 : Observation MEB de composite NewGel implanté dans le corps vertébral de chèvre et analyse d'image par traitement de gris.....	p78
Figure 25 : Formule générale d'un poloxamère.....	p80
Figure 26 : Composites CitaGel 6040 et 2080 en site musculaire à 6 semaines. Coloration HES.....	p83
Figure 27 : Composite CitaGel 2080 implanté en site osseux à 6 semaines. Coloration Movat et MEB rétrodiffusé.....	p83
Figure 28 : Repousse osseuse du composite CitaGel 6040 vs composite CitaGel 2080.....	p84

Liste des figures

Figure 29 : Radiographies du MBCP Gel reconstitué par de l'eau stérile ou une solution iodée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	p87
Figure 30 : MBCP Gel iodé vs MBCP Gel. Ostéogénicité à 6 semaines en site osseux chez le lapin.....	p88
Figure 31 : Diffraction X des différents granules phosphocalciques.....	p91
Figure 32 : Spectres infrarouges des groupements phosphates des différents granules phosphocalciques radiopaques.....	p92
Figure 33 : Observation MEB des différents granules phosphocalciques radiopaques.....	p93
Figure 34: Observation MEB des différents granules BCP radiopaques implantés chez le rat à 3 semaines avant traitement d'images.....	p94
Figure 35 : Coloration au pentachrome de Movat des différents granules après 3 semaines d'implantation en site osseux chez le rat.....	p95
Figure 36: Radiographies des épiphyses fémorales comblées avec les différentes granules BCP radiopaques.....	p96
Figure 37 : Radiographie d'un ciment phosphocalcique (MCPC®) rendu radiopaque par ajout de granules radiopaques et implanté en site corps vertébral.....	p98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 8 : Les cellules osseuses, leurs fonctions et marqueurs.....	p11
Tableau 9 : Les différentes réponses biologiques possibles générées au contact du biomatériau implanté.....	p15
Tableau 10 : Les principaux paramètres physico-chimiques du matériau influençant la réponse hôte.....	p16
Tableau 11 : Catégories et indications des biomatériaux utilisés en réparation osseuse.....	p22
Tableau 12 : Propriétés du substitut osseux.....	p23
Tableau 13 : Exemple de potentiels zeta mesurés sur différents types de céramiques phosphocalciques dans différentes conditions selon Suzuki.....	p30
Tableau 14 : Impact des paramètres d'atomisation sur les propriétés des granules formés....	p55
Tableau 8 : Mesure de l'écrasement et des propriétés mécaniques de l'association du composite NewGel à un ballonnet pour kyphoplastie.....	p74
Tableau 9 : Mesure de repousse osseuse et de résorption du matériau après 6 mois d'implantation en site vertébral chez la chèvre. Comparaison à un corps vertébral sain.....	p78
Tableau 10 : Ratio polymère thermosensible/granules CaP, compatibles avec l'extrusion...	p82
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des changements de position des pics HA, β -TCP et des intensités relatives β -TCP/HA en fonction des composés radiopaques ajoutés au BCP.....	p92

Serge BAROTH

Développement de céramiques phosphocalciques injectables pour la reconstruction osseuse

Thèse de Doctorat, Université de Nantes (Mars 2009)

Nombre de pages : 125 ; Nombre de tableaux : 11 ; Nombre de figures : 37

RESUME

Les substituts osseux synthétiques constituent une alternative à l'utilisation des greffes osseuses. Parmi ces matériaux, les céramiques phosphocalciques sont des candidats de choix puisque biocompatibles, ostéogéniques et disponibles sous plusieurs formes leur permettant de s'adapter à l'indication (blocs, granules, revêtement). Avec le développement de la chirurgie osseuse à minima, le besoin en substituts osseux injectables est devenu nécessaire. Le « granule concept » développé par Daculsi est à la base de matériaux composites injectables associant des granules de céramique pour l'ostéogénicité et des matériaux apportant propriétés mécaniques ou d'injection (ciments, polymères). Dans ce cadre nous avons développé et testé plusieurs matériaux injectables. Nous avons d'abord cherché à améliorer l'injection de ces matériaux en optimisant la forme des granules de céramique par différents procédés. Ces granules servant d'échafaudage à la repousse osseuse ont servi de base à l'élaboration de nos matériaux injectables qui par leur composition possèdent des procédés de repousse différents. Notre premier matériau, une pâte de céramique phosphocalcique, composée de plusieurs fractions de granules de phosphate de calcium biphasé (BCP) favorise la repousse osseuse en induisant une réaction inflammatoire locale. Ensuite, 2 types de suspensions injectables ont été mises au point et dont la composition de la phase continue constituée de polymères innovants est changée. Enfin, pour les besoins en matériaux radiopaques pour les indications en chirurgie du rachis, nous avons optimisé le contraste apporté par les granules de BCP en leur associant des composés radiopaques. Ce travail a donné lieu à la commercialisation d'un substitut osseux (Hydros®) et au dépôt de 2 brevets concernant la mise au point de BCP radiopaque et d'un polymère innovant.

DISCIPLINE : Ingénierie osseuse

MOTS CLES : Céramiques phosphocalciques biphasées, chirurgie à minima, « granule concept », réparation osseuse.

ABSTRACT

Synthetic bone grafts represent alternatives to autologous bone grafts. Calcium phosphate bioceramics are perfect candidates as they are biocompatible and provide osteogenic properties and are available under numerous shapes to fit perfectly various surgical applications (bulk, granules or coatings). Moreover, minimal invasive surgery (MIS) led the development of injectable bone substitutes. The “granule concept”, developed by Daculsi, allows the expansion of new injectable composite materials composed of CaP granules for bioactivity and other materials, as polymers or CaP cements, to improve injectable and/or mechanical properties. In this context we have tested new injectable materials. First of all, injectability has been improved by using various galenic methods to optimized granule shape. These granules have been used for the conception of our osteogenic injectable materials. Our first material, a putty, is composed of several fractions of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) nano- micro-particles and granules, improve bone ingrowth by inducing local inflammatory response. Then, two calcium phosphate granule suspensions have been developed that are composed of two new polymeric phases. Finally, for minimal invasive surgery (MIS), BCP material radiopacity has been improved. From this work, one substitute has been commercialized and two patent have been deposited.

KEY WORDS: Biphasic calcium phosphate ceramics, minimal invasive surgery, “granule concept”, bone repair.