

UNIVERSITE DE NANTES
UFR D'ODONTOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biomatériaux

Elise VERRON

**Intérêt des associations « phosphates de calcium-principe actif »
en chirurgie de reconstruction osseuse :
Applications aux fractures ostéoporotiques et à la douleur**

Présentée et soutenue publiquement le 10 Juillet 2009
Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

M^{me} Nathalie ROCHET : Chargée de Recherche INSERM, Université de Nice

M^f Dominique PIOLETTI : Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

Examineurs :

M^f Didier MAINARD : Professeur, Université Henri-Poincaré, Nancy

M^f Olivier GAUTHIER : Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes

Membre invité :

M^f Pascal JANVIER : Maître de Conférences, Université de Nantes

Directeurs de thèse :

M^f Jean-Michel BOULER : Professeur, Université de Nantes

M^f Jérôme GUICHEUX (Co-directeur) : Directeur de Recherche INSERM, Nantes

PLAN DE LA THESE

Résumé / Abstract

Liste des publications

Abréviations

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PARTIE A : PRINCIPES GENERAUX

Chapitre 1 : L'os

Chapitre 2 : Les substituts osseux

Chapitre 3 : Les systèmes combinés

PARTIE B : DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A LIBERATION DE PRINCIPES ACTIFS A PARTIR DE PHOSPHATES DE CALCIUM

Chapitre 1 : Système à libération de bisphosphonates

- A. Le contexte clinique : Les fractures ostéoporotiques
- B. Association phosphates de calcium-bisphosphonates

Chapitre 2 : Système à libération d'anesthésiques locaux

- A. Le contexte clinique : La douleur osseuse postopératoire
- B. Association phosphates de calcium-anesthésiques locaux

PARTIE C : ETUDE DES EFFETS CELLULAIRES DU GALLIUM

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES ILLUSTRATIONS

ANNEXES

RESUME

En chirurgie de reconstruction osseuse, une nouvelle génération de matériaux phosphocalciques (PCa) a été développée pour libérer *in situ* des principes actifs (PA). Des solutions thérapeutiques locales ont été envisagées en vue de consolider des sites fragilisés par l'ostéoporose et ainsi de prévenir le développement de fractures. Des PCa ont été associés avec des bisphosphonates, inhibiteurs reconnus de la résorption osseuse (IRO) largement prescrits dans le traitement de l'ostéoporose. L'évaluation *in vitro* indique que ces systèmes inhibent la résorption ostéoclastique sans affecter les ostéoblastes. L'amélioration de la microarchitecture osseuse a été mise en évidence après implantation de ces systèmes combinés en site fémoral chez des rates et des brebis ovariectomisées. Le gallium (Ga) a également été envisagé pour développer un nouveau dispositif combiné puisqu'il est susceptible de s'incorporer dans la maille cristalline des PCa et de présenter un potentiel d'IRO. L'effet du Ga sur les cellules osseuses a été clarifié par rapport aux données contradictoires de la littérature. Dans cette même stratégie d'approche locale, des PCa ont été associés avec un principe actif à visée analgésique, la bupivacaïne, pour la prise en charge de la douleur postopératoire associée au prélèvement osseux. Les études réalisées à partir d'un modèle *in vivo* de douleur postopératoire ont mis en évidence l'effet analgésique à court terme de ce dispositif combiné. Ces systèmes à libération de PA devraient répondre à des problématiques rencontrées en chirurgie de reconstruction osseuse : la fragilité osseuse liée à l'ostéoporose et la douleur postopératoire.

ABSTRACT

In bone reconstructive surgery, a new generation of bone substitutes has been developed based on the association of calcium phosphate (CaP) with therapeutic agent (TA). An innovative bisphosphonates (BP)-combined CaP matrix has been proposed to reinforce locally osteoporotic bone and therefore to prevent the development of fractures. BP are well known antiresorptive agents largely used in the treatment of osteoporosis. The *in vitro* studies have indicated that this combined device inhibits the osteoclastic resorption without affecting the osteoblasts. Improvement of bone microarchitecture has been observed by implanting this combined device within osteoporotic rat and ewe femurs. Gallium (Ga) has also been considered to develop a new combined device since it can be incorporated in the CaP crystalline structure and present a potent inhibitory effect on bone resorption. The biological effects of Ga on bone cells have been clarified given the confusing data obtained from literature. A local approach has been proposed for the global management of post-operative pain following bone reconstructive surgery by associating local anesthetic with CaP biomaterials, thereby acting directly *in situ*. From an *in vivo* postoperative pain model, a dose-dependent analgesic effect was observed with this combined device. To summary, these combined drug devices could be proposed for the prevention of osteoporotic fractures and could be integrated into a global pain management program, for example, in the context of autologous bone harvesting.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	10
Partie A PRINCIPES GENERAUX	15
Chapitre 1 L'OS	16
I Définition et fonctions du tissu osseux	16
II Composition du tissu osseux	16
II.1 Les cellules	16
II.1.1 Les ostéoblastes	17
II.1.2 Les ostéocytes	18
II.1.3 Les cellules bordantes	18
II.1.4 Les ostéoclastes.....	18
II.2 La matrice extracellulaire	19
II.2.1 La matrice organique	19
II.2.2 La matrice inorganique	19
III La structure du tissu osseux	20
III.1 Le tissu osseux compact.....	20
III.2 Le tissu osseux spongieux.....	21
III.3 Microarchitecture osseuse.....	21
IV Le remodelage osseux	22
IV.1 Le cycle du remodelage osseux	22
IV.2 Régulation du métabolisme osseux.....	24
IV.2.1 Régulation locale.....	24
IV.2.2 Régulation systémique	25
Chapitre 2 LES SUBSTITUTS OSSEUX.....	27
I La greffe osseuse	27
I.1 Greffe autologue	27
I.2 Greffe allogénique	28
I.3 Xénogreffe	29
II Les substituts osseux	29
II.1 Propriétés d'un substitut osseux « idéal »	29
II.2 Céramiques phosphocalciques	30
II.2.1 L'hydroxyapatite.....	31
II.2.2 Le phosphate tricalcique bêta.....	31
II.2.3 Les biphasés	32
II.3 Ciment phosphocalcique	32
II.3.1 Principe d'obtention.....	32
II.3.2 Les applications cliniques	33
II.3.3 Conclusion	33
Chapitre 3 LES SYSTEMES COMBINES (Revue).....	35

Partie B	DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A LIBERATION DE PRINCIPES ACTIFS A PARTIR DE PHOSPHATES DE CALCIUM	36
Chapitre 1	SYSTEME A LIBERATION DE BISPHOSPHONATES	37
	A. Le contexte clinique : LES FRACTURES OSTEOPOROTIQUES	38
I	Généralités	38
II	Les fractures	38
II.1	Les principaux sites ostéoporotiques	38
II.1.1	Fracture du radius distal	39
II.1.2	Fracture vertébrale	40
II.1.3	La fracture de l'extrémité supérieure du fémur.....	41
II.1.4	Autres fractures ostéoporotiques.....	42
II.2	Conséquences économiques.....	42
II.3	Les facteurs de risque	42
II.4	Diagnostic	44
II.4.1	Mesure de la DMO	44
II.4.2	Anamnèse et examen clinique.....	44
II.4.3	Exploration biologique.....	45
II.4.4	Examens radiologiques	46
III	Les traitements	46
III.1	Traitements non pharmacologiques	48
III.2	Traitements médicamenteux	48
III.2.1	Les bisphosphonates.....	49
III.2.1.1	Relation structure-activité	49
III.2.1.2	Pharmacocinétique	51
III.2.1.3	Efficacité clinique.....	52
a.	Conséquences sur la DMO et les marqueurs du remodelage osseux.....	52
b.	Conséquences sur le risque fracturaire.....	53
c.	Conséquences sur le taux de mortalité	54
III.2.1.4	Limites du traitement.....	55
a.	Données pharmacocinétiques.....	55
b.	Effets secondaires	55
c.	Observance.....	55
III.3	Autres traitements médicamenteux	58
III.3.1	Traitement hormonal substitutif	58
III.3.2	Le raloxifène	59
III.3.3	La calcitonine	60
III.3.4	L'Hormone parathyroïde	60
III.3.5	Le ranelate de strontium	60
III.3.6	Les inhibiteurs de RANK-L	61

B. ASSOCIATION PHOSPHATES DE CALCIUM-BISPHOSPHONATES	62
I Problématique	63
II Evaluation <i>in vitro</i> de la libération contrôlée de bisphosphonates à partir de biomatériaux phosphocalciques (article 1).....	66
III Evaluation <i>in vivo</i> de la CDA chargée en zolédronate sur le renforcement osseux en site ostéoporotique (article 2).....	68
IV Discussion.....	70
Chapitre 2 SYSTEME A LIBERATION D'ANESTHESIQUES LOCAUX	78
A. Le contexte clinique : LA DOULEUR OSSEUSE POSTOPERATOIRE	79
I Introduction	79
II Les dimensions de la douleur	79
III Innervation de l'os	80
IV Physiologie de la douleur.....	81
IV.1 La douleur périphérique.....	81
IV.2 Transmission du message nociceptif de la périphérie au cortex cérébral	83
V Description de la douleur postopératoire.....	85
VI Prise en charge thérapeutique de la douleur postopératoire	86
VI.1 L'analgésie systémique.....	86
VI.1.1 Les principales molécules	86
VI.1.1.1 Les anti-inflammatoires	86
VI.1.1.2 Le paracétamol.....	88
VI.1.1.3 Le nefopam	88
VI.1.1.4 Les opioïdes faibles.....	88
VI.1.1.5 Les morphiniques	88
VI.1.1.6 La kétamine.....	89
VI.1.1.7 Les anesthésiques locaux	90
a. Effet anesthésique	90
b. Effets anti-inflammatoires	94
c. Pharmacocinétique	94
d. Effets secondaires	95
VI.1.2 L'analgésie préventive	96
VI.1.3 L'analgésie multimodale.....	97
VI.2 L'analgésie locorégionale	97
VI.2.1 Les blocs périnerveux périphériques.....	98
VI.2.2 Les infiltrations	98
VI.2.3 Cas particulier : la douleur après le prélèvement de crête iliaque	99

B. ASSOCIATION PHOSPHATES DE CALCIUM – ANESTHESIQUES LOCAUX.....	100
I Problématique.....	102
II Dispositif combiné « CDA- Bupivacaïne » dans la prise en charge de la douleur osseuse postopératoire (article3)	103
III Discussion.....	105
Partie C ETUDE DES EFFETS CELLULAIRES DU GALLIUM.....	109
I Introduction	110
II Données de la littérature	111
II.1 L’élément Gallium.....	111
II.2 Applications cliniques.....	112
II.3 Mécanisme d’action.....	113
II.4 Le gallium et les cellules osseuses.....	115
II.4.1 Distribution osseuse du gallium.....	115
II.4.2 Activités <i>in vitro</i> du gallium	115
II.4.2.1 Activité de résorption ostéoclastique	115
II.4.2.2 Activité ostéoblastique.....	116
II.4.3 Activité <i>in vivo</i> du gallium.....	117
III Etude <i>in vitro</i> du gallium sur les cellules osseuses.....	117
III.1 Problématique	117
III.2 Résumé de l’article (article 4).....	118
III.3 Discussion.....	120
CONCLUSION	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
LISTE DES ILLUSTRATIONS	147
ANNEXES.....	150

INTRODUCTION

Le tissu osseux comporte une matrice extracellulaire minéralisée qui lui confère plusieurs fonctions : une fonction mécanique, de protection des organes et de support du poids de l'organisme, une fonction métabolique et une fonction hématopoïétique. Ainsi, le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan métabolique que sur le plan biomécanique. Pour assurer ses fonctions, le tissu osseux est en perpétuel remaniement selon un processus cellulaire de remodelage. L'os est donc un tissu dynamique, vivant qui possède la capacité de s'auto-régénérer.

La réparation du tissu osseux est un phénomène complexe faisant intervenir un ensemble de cytokines, d'hormones et facteurs de croissance^{1,2}. Cette cascade biologique va recruter et activer les progéniteurs et cellules inflammatoires nécessaires pour une réparation efficace du tissu lésé. Cette réparation spontanée n'est valable que pour des pertes de substances osseuses de petites tailles, plus communément appelées défauts non critiques c'est-à-dire dont la taille est inférieure au diamètre de l'os. Au-delà, l'importance du défaut impose alors de stimuler l'ostéogénèse notamment par l'utilisation de greffes osseuses.

Le recours aux greffes osseuses est en constante progression, essentiellement liée aux traumatismes osseux, à la chirurgie de révision prothétique et aux arthrodèses vertébrales. Les greffes osseuses biologiques les plus fréquemment rencontrées sont les autogreffes et les allogreffes^{3,4}. L'autogreffe correspond à un prélèvement osseux au niveau d'un second site opératoire et présente de nombreux avantages en terme de tolérance et de potentiel ostéogénique qui justifient sa large utilisation en chirurgie de reconstruction⁵. En revanche, le prélèvement du greffon s'accompagne de douleurs post-opératoires sévères, d'hernies iliaques ou encore d'hémorragies⁶. Par ailleurs, le volume de la greffe osseuse prélevée est généralement limité à 20 cm³. Un autre type de greffe est également disponible, il s'agit de l'allogreffe. L'emploi de cette dernière génère généralement une réaction inflammatoire qui compromet le processus de résorption/substitution osseuse et peut entraîner le rejet du greffon⁷.

Face aux limites des greffes osseuses, des alternatives ont été envisagées avec le développement des substituts osseux^{7,8}. Actuellement, les substituts osseux sont majoritairement des composés inorganiques et parfois des composites (association inorganique/ polymères...). Les matériaux inorganiques, utilisés en tant que substituts osseux,

appartiennent à trois grandes familles : les phosphates de calcium, les sulfates de calcium et les carbonates de calcium. Les phases minérales des vertébrés sont composées de phosphates de calcium ce qui explique que ces derniers présentent une cinétique de résorption/substitution plus adaptée au remodelage osseux, les autres espèces calciques étant trop solubles pour permettre une néoformation osseuse de qualité. Les phosphates de calcium sont efficaces dans de nombreuses indications cliniques que ce soit en orthopédie, en chirurgie dentaire et en chirurgie maxillo-faciale⁹⁻¹¹. Néanmoins, leur potentiel ostéogénique limité et leurs faibles propriétés mécaniques initiales constituent leurs principales limites par rapport aux greffes osseuses. Par ailleurs, leur utilisation est réservée essentiellement aux sites osseux sains. Toute situation pathologique que ce soit lors d'infection, d'irradiation et d'ostéoporose, est défavorable au processus de résorption/ substitution de l'implant.

Les recherches actuelles visent à améliorer, d'une part, le potentiel ostéogénique des substituts osseux en site osseux sain et, d'autre part, à apporter une réponse lors de contextes cliniques jugés critiques (ostéoporose, infection, inflammation, irradiation...). C'est dans cette optique qu'ont été développés des systèmes mixtes, combinant des substituts osseux avec des molécules actives. Ainsi, par cette approche combinée, les substituts osseux libèrent directement *in situ* l'agent thérapeutique et confèrent ainsi à ces dispositifs de nombreux intérêts vis-à-vis d'un traitement systémique en terme d'efficacité thérapeutique et de tolérance. Par ailleurs, ces systèmes combinés se distinguent des vecteurs classiques de libération de médicaments en ce sens qu'ils participent activement à la reconstruction osseuse.

Ce travail de thèse repose sur l'apport potentiel des systèmes combinés en chirurgie de reconstruction osseuse. Nous avons abordé deux situations cliniques rencontrées en chirurgie orthopédique : la fragilité osseuse liée à l'ostéoporose et la douleur osseuse postopératoire après un acte de prélèvement osseux.

L'ostéoporose résulte d'une dérégulation du métabolisme osseux en faveur de l'activité ostéoclastique qui se manifeste cliniquement par le développement de fractures¹². Ces fractures handicapent lourdement le quotidien du patient et peuvent même compromettre le pronostic vital des personnes âgées. La prévention de ces fractures constitue donc un enjeu majeur de santé publique en terme de coûts humains et financiers. Ces fractures osseuses touchent préférentiellement le fémur proximal, le rachis et le poignet. Cette spécificité des

sites à fort risque fracturaire justifie l'intérêt d'une approche locale. Dans ce contexte, nous avons mis au point des systèmes à libération de principes actifs, basés sur l'association entre des substituts osseux phosphocalciques et des inhibiteurs de la résorption osseuse (IRO). La structure chimique des phosphates de calcium (PCa) rend possible leurs substitutions partielles par des groupements d'atomes ou des ions. Cette propriété chimique a été exploitée pour associer des bisphosphonates aux PCa. Les bisphosphonates font partie des IRO efficaces et largement prescrits dans le traitement de l'ostéoporose¹³. Les évaluations *in vitro* et *in vivo* de ces associations ont fait l'objet d'articles inclus dans ce manuscrit.

Dans l'optique de développer de nouveaux systèmes combinés osseux, nous nous sommes intéressés à une autre problématique rencontrée en chirurgie osseuse, la douleur osseuse postopératoire associée à un acte de prélèvement osseux. Cette douleur est intense durant les premiers jours qui suivent l'intervention chirurgicale. Initialement périphérique, elle se propage jusqu'au système nerveux central entraînant sa chronicité. Un traitement inadapté de la douleur prolonge l'alitement du patient et retarde les séances de kinésithérapie qui sont essentielles pour une réhabilitation fonctionnelle précoce du patient. La stratégie thérapeutique actuellement proposée au patient repose sur l'association d'une approche systémique et locale^{14,15}. Nous nous sommes appuyés sur l'apport reconnu de l'analgésie locale dans la douleur postopératoire pour développer un système phosphocalcique à libération d'une molécule à visée analgésique, la bupivacaïne. Ce dispositif combiné est envisagé dans la gestion de la douleur postopératoire après prise de greffon d'os iliaque qui est considéré comme un acte particulièrement douloureux. Le substitut osseux combiné permettra (1) de reconstruire le défaut osseux et ainsi de reconstituer le capital osseux du patient en vue d'éventuelles greffes ultérieures et (2) de libérer *in situ* la bupivacaïne pour participer à la prise en charge globale de la douleur. Nos travaux ont été menés en vue d'évaluer l'effet analgésique de la libération locale de la bupivavaïne par un vecteur phosphocalcique.

Enfin, dans l'objectif de développer de nouveau dispositif combiné, nous avons recherché d'autres agents thérapeutiques qui peuvent être associés avec des PCa par substitution ionique. Nous nous sommes alors intéressés au gallium (Ga) qui est susceptible de (1) s'incorporer, sous forme ionique (Ga^{3+}), dans la maille cristalline des PCa et (2) présenter un potentiel d'IRO. Compte tenu de l'absence de données bibliographiques concordantes

concernant l'effet du Ga sur les cellules osseuses, il nous est apparu nécessaire de clarifier, dans un premier temps, l'effet biologique du Ga. L'évaluation *in vitro* du Ga nous permettra de décider si il est pertinent de considérer le Ga comme un candidat intéressant pour le développement d'un nouveau système phosphocalcique combiné.

Ainsi après avoir rappelé, dans la première partie de ce travail, les principes généraux (Partie A), relatifs à l'os, aux substituts osseux et aux systèmes phosphocalciques combinés, nous décrirons le développement et l'évaluation biologique de deux systèmes phosphocalciques combinés (Partie B) appliqués d'une part aux déséquilibres de la résorption osseuse (Chapitre I) et d'autre part à la douleur osseuse postopératoire (Chapitre II). Enfin, nous consacrerons notre dernière partie à la caractérisation des effets biologiques du gallium (Partie C), avant de conclure sur l'intérêt des systèmes combinés en chirurgie de reconstruction osseuse.

Partie A PRINCIPES GENERAUX

Chapitre 1 : L'OS

Chapitre 2 : LES SUBSTITUTS OSSEUX

Chapitre 3 : LES SYSTEMES COMBINES

« Calcium Phosphate biomaterials as bone drug delivery systems : a review »

E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, JM. Bouler

Drug Delivery Today (Préparation pour soumission)

Chapitre 1 L'OS

I Définition et fonctions du tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif squelettique caractérisé par la présence d'une abondante matrice extracellulaire (MEC). Cette matrice osseuse a la particularité de se calcifier, ce qui la rend opaque aux rayons X et permet l'étude des os par radiographie.

Le squelette présente 3 fonctions.

-Fonction mécanique : le tissu osseux est un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter des contraintes mécaniques, conférant à l'os son rôle de soutien du corps et de protection des organes. De plus, il permet l'insertion des muscles.

-Fonction métabolique : le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé sous l'effet des pressions mécaniques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant ainsi dans une large mesure (conjointement avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

-Fonction hématopoïétique : les os renferment dans leurs espaces médullaires la moelle hématopoïétique. Les cellules souches de la moelle hématopoïétique sont à l'origine des 3 lignées de cellules sanguines. Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques. Certaines d'entre elles sont des cellules souches multipotentes susceptibles de se différencier dans de multiples lignages différents (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes...).

II Composition du tissu osseux

II.1 Les cellules

Le tissu osseux est constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire¹⁶. Le tissu osseux contient 4 types cellulaires. Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont les cellules ostéoformatrices. Les ostéoclastes sont ostéorésorbants. Les ostéoblastes, les

ostéoclastes et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface des plages de tissu osseux, alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse.

Contrairement aux cellules ostéoformatrices qui dérivent de cellules souches mésenchymateuses¹⁷, les ostéoclastes dérivent de la lignée hématopoïétique monocyttaire (colony forming unit-macrophage CFU-M) .

II.1.1 Les ostéoblastes

Ce sont des cellules ostéoformatrices cubiques situées à la surface de l'os. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de marqueurs phénotypiques précoces tels que le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH-R), la phosphatase alcaline (PAL), le collagène de type I (Coll-I), l'ostéopontine (OP) et de marqueurs spécifiques tardifs notamment la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine (OC) (figure 1)¹⁸.

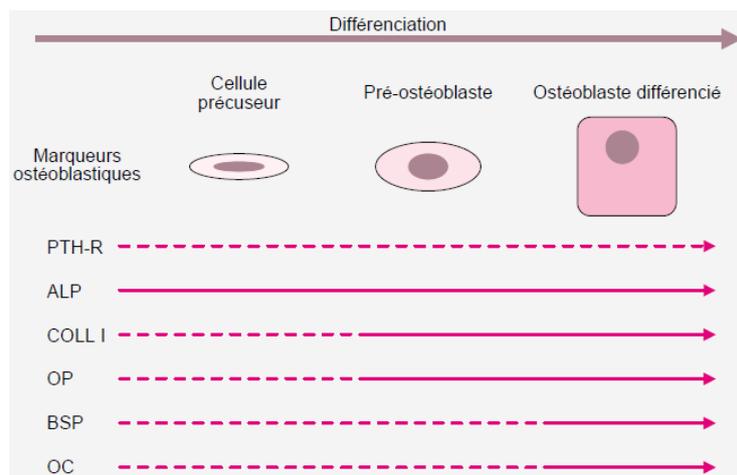


Figure 1: Marqueurs de la différenciation ostéoblastique¹⁸

Les ostéoblastes sont reliés entre eux et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes¹⁹. Leur membrane plasmique renferme en abondance de la phosphatase alcaline. Les ostéoblastes élaborent les constituants organiques de la MEC. Ces cellules contribuent à la différenciation des ostéoclastes en sécrétant des cytokines. Le devenir des ostéoblastes peut se faire selon 3 voies :

- transformation en ostéocytes en s'entourant complètement de MEC,
- mise au repos sous la forme de cellules bordantes tapissant les surfaces osseuses
- mort par apoptose.

II.1.2 Les ostéocytes

Ce sont des ostéoblastes matures, incapables de se diviser, entièrement entourés par la MEC osseuse minéralisée²⁰. Les ostéocytes siègent dans des cavités appelées ostéoplastes, d'où partent des canalicules anastomosés contenant leurs prolongements cytoplasmiques, fins, nombreux, plus ou moins longs, reliés entre eux par des jonctions communicantes¹⁹. Ces canalicules permettent le transport des nutriments au sein des ostéocytes et l'évacuation de leurs déchets. Leur corps cellulaire est de plus petite taille que celui des ostéoblastes, fusiforme, possédant moins d'organites que les ostéoblastes. Les ostéocytes pourraient intervenir dans la synthèse et la minéralisation de la MEC. Par ailleurs, ils participeraient au contrôle du remodelage osseux par des phénomènes de mécanotransduction en détectant des variations de contraintes mécaniques²¹.

II.1.3 Les cellules bordantes

Il s'agit d'ostéoblastes au repos, susceptibles, s'ils sont sollicités, de redevenir des ostéoblastes actifs. Elles revêtent la surface osseuse au niveau de l'endoste et du périoste. Ce sont des cellules aplaties et allongées, possédant peu d'organites et reliées entre elles et avec les ostéocytes voisins par des jonctions communicantes.

II.1.4 Les ostéoclastes

L'ostéoclaste est une cellule multinucléée, très volumineuses, de 20 à 100 μm de diamètre, d'origine hématopoïétique²². La spécification des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription et de facteurs de croissance dont les principaux sont le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), le ligand du RANK (Receptor Activator of Nuclear factor KappaB) et l'ostéoprotégérine (OPG). La fusion des cellules précurseurs entraîne la formation d'une cellule multinucléée. Lorsqu'il est activé, l'ostéoclaste, cellule ostéorésorbante, développe son appareil lysosomal et se polarise fortement ; sa membrane plasmique se différencie en deux domaines séparés par un anneau étanche de jonctions cellule-MEC : un domaine apical qui développe une bordure en brosse au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé^{23,24}. Cette bipolarité morphologique est essentielle à sa fonction de résorption osseuse. L'ostéoclaste sécrète par sa bordure en brosse apicale des protons qui acidifient le compartiment de résorption et plusieurs types d'enzymes néosynthétisées : il s'agit de phosphatases acides, d'arylsulfatases, de la β -

glucuronidase, de la β -glycérophosphatase, de diverses cystéine-protéinases incluant les cathépsines B, C, D, L et la cathépsine K et également des métalloprotéases telles que les gélatinases et les collagénases de type I et IV²⁵. Ces enzymes actives à pH acide participent à la dégradation de la matrice extracellulaire. Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste, cellule hautement mobile, se déplace à la surface des travées osseuses créant une succession de lacunes de résorption, son activité alternant phases de résorption et de migration²⁵. Après un nombre probablement déterminé de cycles « résorption-migration », l'ostéoclaste entre dans un processus d'apoptose.

II.2 La matrice extracellulaire

Le tissu osseux, qu'il soit cortical ou spongieux, est constitué d'une matrice osseuse minéralisée. La matrice extracellulaire (MEC) occupe de 92 à 95% du volume tissulaire et comprend une phase organique (22%) et inorganique (69%). La teneur en eau, environ 9%, est très variable selon l'âge et le degré de minéralisation.

II.2.1 La matrice organique

La MEC organique forme l'ostéoïde qui correspond à la substance « préosseuse » non encore minéralisée. Elle est composée de microfibrilles de collagène I (environ 90%), de protéoglycanes, d'ostéopontine (reliant la MEC aux cellules osseuses), d'ostéonectine (intervenant dans la minéralisation par son affinité pour le collagène I et le calcium), d'ostéocalcine (marqueur des ostéoblastes matures, intervenant dans la minéralisation), de sialoprotéine osseuse et de thrombospondine (permettant l'adhésion cellulaire à la MEC via un récepteur membranaire de la famille des intégrines). La MEC osseuse contient des cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes et jouant un rôle fondamental dans la régulation du remodelage du tissu osseux et de la minéralisation de la MEC osseuse.

II.2.2 La matrice inorganique

L'os est un réservoir métabolique de sels minéraux (calcium, phosphate...). Par exemple, l'os, qui contient 99 % du calcium et 85% du phosphate de l'organisme, représente un réservoir important de calcium et de phosphate et joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. Les sels minéraux prendront progressivement la place de l'eau au cours de

la minéralisation de la substance ostéoïde. La minéralisation de la MEC osseuse participe à la dureté de l'os.

La matrice minérale est constituée de cristaux d'apatite biologique. Il s'agit d'apatite peu cristallisée, non stoechiométrique, polysubstituée majoritairement de carbonate. Ces cristaux sont visibles en microscopie électronique entre les fibres de collagène et/ou à l'intérieur de celles-ci, sous la forme de petites aiguilles hexagonales, denses aux électrons. Les ions Ca^{++} et PO_4^{3-} situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec les fluides biologiques.

III La structure du tissu osseux

Chez l'adulte, le tissu osseux est dit lamellaire, parce que la matrice osseuse est disposée en lamelles superposées où les microfibrilles de collagène sont arrangées parallèlement selon une direction qui se modifie dans chaque lamelle successive. Chez le fœtus et le jeune enfant, ou en cas de fracture, la trame de microfibrilles de collagène produite par les ostéoblastes est irrégulière et le tissu osseux est transitoirement non-lamellaire (« tissu osseux tissé »).

Le squelette humain est composé d'environ 20% d'os trabéculaire et de 80% d'os cortical. L'os trabéculaire a un niveau de remodelage supérieur à celui de l'os cortical.

III.1 Le tissu osseux compact

Le tissu osseux compact (figure 1), appelé aussi cortical, est principalement constitué d'ostéons ou systèmes de Havers fait de lamelles osseuses cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers. Entre les lamelles, se situent les ostéoplastes contenant le corps cellulaire des ostéocytes. Le canal de Havers contient des capillaires sanguins et des filets nerveux amyéliniques enrobés d'un peu de tissu conjonctif lâche. Les canaux de Havers sont reliés entre eux, avec la cavité médullaire et avec la surface de l'os par des canaux transversaux ou obliques, les canaux de Volkmann. Son architecture est conditionnée par les forces mécaniques qui s'exercent sur lui.

III.2 Le tissu osseux spongieux

Le tissu osseux spongieux (figure 2), appelé aussi trabéculaire, siège essentiellement dans les os courts et les os plats (sternum, ailes iliaques) ainsi que dans les épiphyses des os longs. Il est formé par un lavis tridimensionnel de spicules ou trabécules de tissu osseux, ramifiés et anastomosés, délimitant un labyrinthe d'espaces intercommunicants occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux.

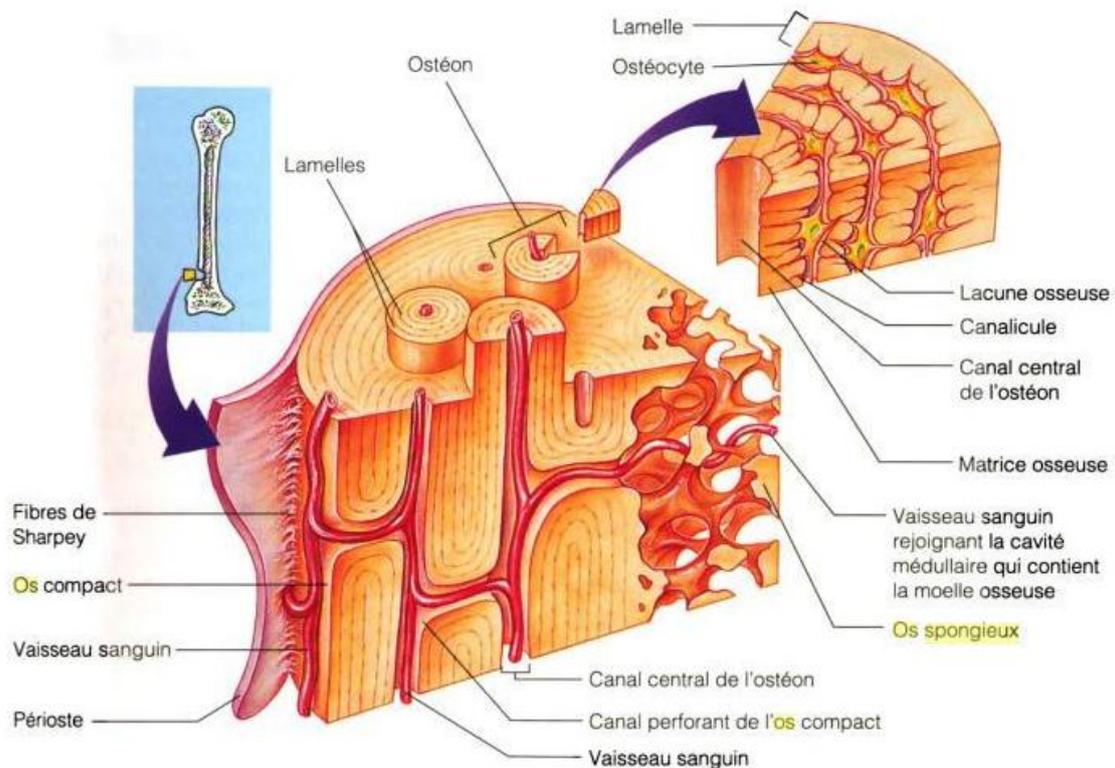


Figure 2: Structure de l'os²⁶

III.3 Microarchitecture osseuse

La microarchitecture osseuse est caractérisée par différents paramètres morphologiques et topologiques du tissu osseux cortical et trabéculaire²⁷. Ces paramètres décrivent le tissu osseux cortical selon son épaisseur moyenne et sa porosité (nombre de canaux de Havers, ...). Les paramètres histomorphométriques statiques utilisés pour décrire l'os trabéculaire sont basés sur les principes définis par Parfitt et al²⁸ qui a assimilé l'os à un biomatériau constitué de plaques connectées entre elles par des piliers transversaux (« plate and rod model »). A partir de ce modèle, de nombreux paramètres peuvent être calculés tels que la fraction volumique osseuse (BV/TV), l'épaisseur des travées (TbTh), le nombre de travées (TbN),

l'espace intertrabéculaire (TbSp). Hahn et al ont défini le facteur de répartition trabéculaire (TbPf)²⁹. Le principe de leur méthode repose sur le fait que dans une structure parfaitement connectée, les surfaces concaves sont abondantes au détriment des surfaces convexes, et inversement dans le cas de structures déconnectées. L'apport de la microtomographie en 3D a permis de définir le volume trabéculaire en 3D, le « structure model index » (SMI), le degré d'anisotropie (orientation des travées dans l'espace)... L'ensemble de ces paramètres microarchitecturaux, avec la densité minérale osseuse, expliquent en grande partie la résistance mécanique osseuse. Néanmoins, d'autres facteurs sont susceptibles d'influencer la résistance osseuse tels que la cristallinité, la taille des cristaux, le degré de maturation du collagène et le niveau de remodelage osseux^{30,31}.

IV Le remodelage osseux

IV.1 Le cycle du remodelage osseux

L'os est un tissu vivant dont le renouvellement physiologique est conditionné par l'activité antagoniste, mais couplée dans le temps de deux types cellulaires : les ostéoclastes et les ostéoblastes. Répondant à un signal d'activation, les ostéoclastes résorbent le tissu osseux « ancien » puis laissent place aux ostéoblastes, responsables de l'élaboration d'une matrice organique ostéoïde qui se minéralise secondairement. Plus précisément, le remodelage osseux se fait en quatre phases successives³² : la phase d'activation, de résorption, d'inversion et enfin de formation (figure 3).

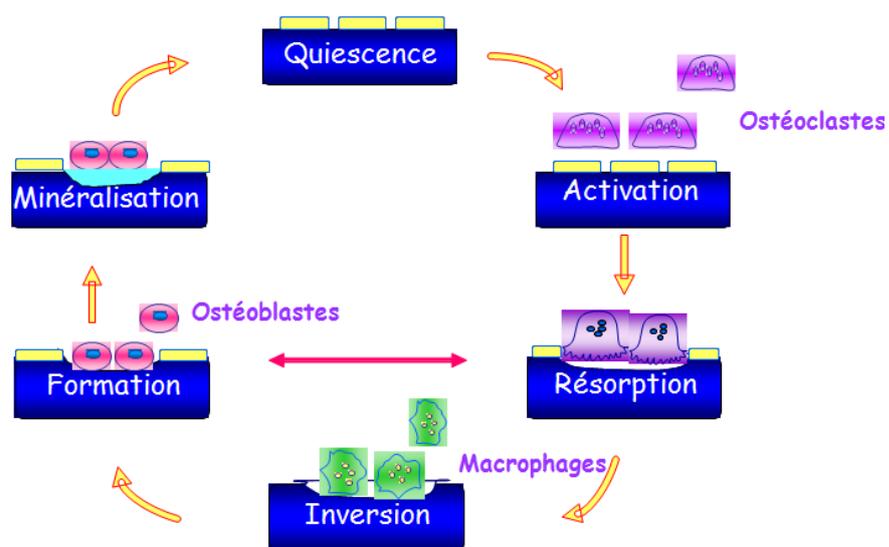


Figure 3: Cycle du remodelage osseux

-La phase d'activation : Lors de sa différenciation dans l'environnement médullaire, le précurseur de l'ostéoclaste est attiré vers la surface osseuse à résorber en réponse à un stimulus chimiotactique. Il le fait grâce à une augmentation de sa motilité, qui permet une extravasation et sa migration vers la surface osseuse. Après avoir atteint la surface osseuse, les précurseurs ostéoclastiques y adhèrent et fusionnent entraînant la formation d'une cellule multinucléée, l'ostéoclaste mature.

-La phase de résorption : Lorsqu'il résorbe activement l'os, l'ostéoclaste est caractérisé par une bipolarité morphologique et fonctionnelle (figure 4)^{22,25}. Le pôle apical s'attache à la matrice osseuse et sécrète un ensemble de substances intracellulaires à travers la bordure en brosse. Plus exactement, la bordure en brosse se divise en une partie sécrétoire, située dans une zone immédiatement concentrique interne à la zone de scellement, et une partie centrale endocytaire²⁴. Le pôle basolatéral, en rapport avec le micro environnement (moelle osseuse et périoste), possède à sa surface de nombreux récepteurs, transporteurs et canaux ioniques responsables des fonctions régulatrices de l'ostéoclaste. D'autre part, le pôle basolatéral contient en son apex un domaine exocytaire correspondant à un processus de transcytose des éléments endocytés au niveau central de la bordure en brosse. Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste migre le long de la surface osseuse en formant des lacunes de résorption. Son activité alterne phases de résorption et de migration. La phase de résorption dure entre 7 et 20 jours, puis les ostéoclastes disparaissent.

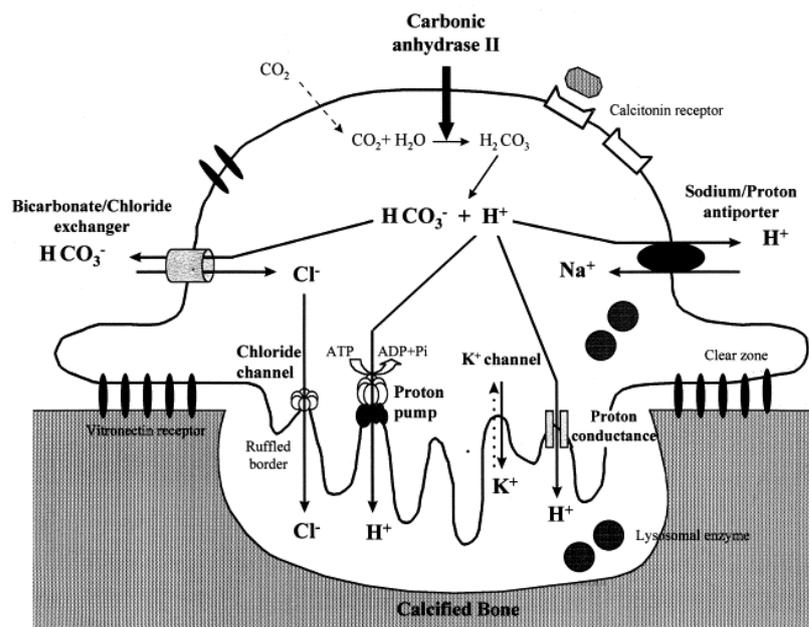


Figure 4: Bipolarité morphologique de l'ostéoclaste³³

L'attachement est une fonction indispensable à l'ostéoclaste lors de ses phases de déplacement le long de la surface osseuse et de résorption. Il se caractérise par des changements morphologiques de l'ostéoclaste avec la formation d'un anneau périphérique d'actine constitué de podosomes³⁴. Par contre, lors de la migration, ces structures disparaissent. Cette aptitude à pouvoir alterner entre attachement et détachement de son substrat fait intervenir des récepteurs membranaires (ex : intégrines...) et nécessite une adaptation morphologique de l'ostéoclaste.

-La phase d'inversion : Une fois la lacune creusée par les ostéoclastes, ils meurent par apoptose et sont remplacés par des cellules phagocytaires mononuclées qui forment la ligne cimentante.

-La phase de formation osseuse : Elle est caractérisée par l'arrivée de vaisseaux sanguins dans la cavité de résorption, avec apport de précurseurs ostéoblastiques. Ces derniers se transforment en ostéoblastes qui déposent le tissu ostéoïde le long de la ligne cimentante. Puis les ostéoblastes deviennent quiescents (cellules bordantes) et bordent le tissu osseux nouvellement formé.

IV.2 Régulation du métabolisme osseux

IV.2.1 Régulation locale

La régulation peut se faire localement à travers divers cytokines et facteurs de croissance^{32,35-38}. Il existe un phénomène de couplage entre l'activité de résorption et de formation osseuse impliquant le récepteur RANK (Receptor Activator of Nuclear factor KappaB), exprimé à la surface des ostéoclastes, et activé par son ligand RANK-L (Receptor Activator of Nuclear factor KappaB Ligand) sécrété par les ostéoblastes. Le RANK-L peut également se lier à l'ostéoprotégérine (OPG) qui joue le rôle de récepteur-leurre soluble synthétisé par de nombreuses cellules hématopoïétiques, sous l'influence notamment du TGF- β (Tumor growth factor). Ainsi, le recrutement d'ostéoclastes est soumis à une régulation locale, à l'échelle d'une unité de remodelage appelée Basic Multicellular Unit (BMU). Le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) induit la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. Les monocytes, les ostéoblastes et les lymphocytes produisent des cytokines inflammatoires ayant des effets pro-ostéoclastogéniques directs. Parmi ces cytokines, on peut citer l'Il-1, l'Il-6 et le TNF- α . Dans les conditions physiologiques, l'Il-1, l'Il-6 et le TNF- α

sont produits en faible quantité, mais cette production augmente considérablement en cas d'inflammation ou de carence oestrogénique. L'IL-1 est capable d'induire la formation des ostéoclastes mais aussi de les activer et de les maintenir en vie. De plus, il stimule la prolifération des ostéoblastes mais inhibe l'activité phosphatase alcaline et la production d'ostéocalcine. Il agit sur les ostéoblastes par une action directe grâce à des récepteurs de surface ou une action indirecte par l'intermédiaire de la synthèse de prostaglandine E2 (PGE2). Le TNF- α permet, quand il est présent en grande quantité, la formation des ostéoclastes. En présence de M-CSF, il induit la différenciation des monocytes en ostéoclastes multinucléés non fonctionnels.

L'expression de RANK-L et d'OPG, par les cellules mésenchymateuses pré ostéoblastiques et les ostéoblastes, est modifiée par les facteurs qui modulent la résorption osseuse *in vivo*. Par exemple, les glucocorticoïdes diminuent l'expression d'OPG par les ostéoblastes. La 1,25 dihydroxyvitamine D, la prostaglandine E2 et la parathormone (PTH) augmentent le rapport des ARNm de RANK-L/OPG par des ostéoblastes. Le RANK-L apparaît aussi comme un médiateur des effets des cytokines précédemment étudiées. En effet, son expression est induite par l'IL-1 et le TNF- α . En outre, le RANK-L permet aussi d'augmenter la survie des ostéoclastes en prévenant leur apoptose. Ce couple OPG et RANK-L semble donc très important dans le contrôle de la résorption osseuse.

IV.2.2 Régulation systémique

A cette régulation locale s'ajoute un contrôle systémique, assuré par des hormones calciotropes (l'hormone parathyroïdienne, la 1,25 dihydroxyvitamine D et la calcitonine) et sexuelles (oestrogènes)^{32,35-38}. La déplétion oestrogénique favorise l'activité de résorption en augmentant le recrutement des ostéoclastes et en prévenant leur apoptose. Par ailleurs, elle entraîne d'une part une hyper expression de l'IL1, IL6, M-CSF, TNF- α , RANK-L et d'autre part, une hypo expression de facteurs tels que l'OPG, IGF (insulin growth factor), TGF- β .

La carence en œstrogène se répercute sur l'activité des ostéocytes. Elle diminue leur survie et bloque la transmission de stimuli mécaniques aux ostéoblastes. Ainsi, consécutif à l'arrêt de la sécrétion des oestrogènes et au cours du vieillissement, le solde d'activité des unités cellulaires du remaniement osseux devient déficitaire car la formation ne compense plus la résorption. Le déséquilibre résulte selon les circonstances d'un excès relatif ou absolu de la

résorption, associé ou non à une baisse de la fonction ostéoblastique. Ainsi, chaque séquence résorption-formation laisse persister un léger déficit osseux. Toute accélération du remodelage osseux multiplie le nombre de légers déficits élémentaires. Ces perturbations du remodelage se traduisent à l'échelle macroscopique par un amincissement de la corticale, des perforations trabéculaires (perforation des plaques, rupture de piliers) qui désorganisent l'architecture du réseau 3D³⁹. La matrice osseuse semble également se détériorer au cours de la ménopause. Il semble que la stabilité des fibres de collagène trabéculaires diminue^{40,41}.

Tous les facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme osseux sont illustrés dans la figure ci-dessous (figure 5, d'après US Department of Health and Human Services)⁴².

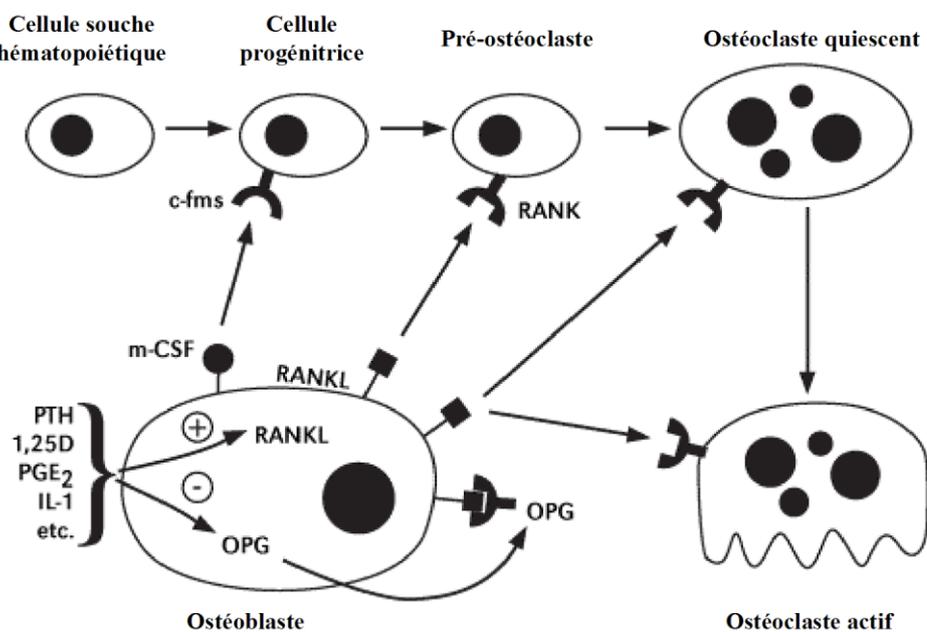


Figure 5: Régulation de l'ostéoclastogénèse⁴²

Chapitre 2 LES SUBSTITUTS OSSEUX

L'os est un tissu vivant qui possède la capacité de s'autorégénérer. En effet, suite à des lésions tissulaires, un ensemble d'évènements biologiques aboutissent à la néoformation d'un tissu osseux. Cette réparation spontanée n'est possible que pour des défauts de petites tailles, dits « non critiques » ; au-delà, l'importance du défaut impose alors son comblement. Les stratégies actuelles de reconstruction incluent les greffes, les biomatériaux implantables de type polymères, céramiques et matériaux composites. L'objectif final est de reconstruire un os fonctionnel présentant les mêmes caractéristiques qu'initialement, notamment en terme de résistance mécanique.

I La greffe osseuse

Il existe différents types de greffe : les greffes massives et les greffes pour comblement cavitaire ou structural. La greffe massive ne sera pas abordée ici. Elle concerne le remplacement d'une partie ou de la totalité d'une pièce osseuse. Exceptionnellement, le chirurgien peut avoir recours à de l'allogreffe massive mais le taux de succès est bas. Dans le cas de greffe morcelée, le recours aux greffes osseuses pour la recapitalisation osseuse demeure majoritaire et est en augmentation soit 12% par an en Europe, avec en 2007, 1,5 millions de procédures chirurgicales qui ont nécessité une greffe. Dans 30% des indications, il s'agit de pertes de substances cavitaires liées à un traumatisme, dans 27% des cas, il s'agit d'arthrodèses et les 43% des cas restants englobent les comblements osseux divers rencontrés en chirurgie orthopédique (exérèse cancéreuse), maxillo-faciale et dentaire.

On distingue trois types de greffes osseuses biologiques selon l'origine du greffon : les autogreffes, les allogreffes et les xéno-greffes.

I.1 Greffe autologue

La moitié des interventions de comblement de défauts osseux nécessite une autogreffe. En pratique, il s'agit de prélèvement osseux avasculaire frais au niveau d'un second site opératoire. Le prélèvement et la greffe sur le site receveur se font pendant l'intervention

chirurgicale. Le prélèvement peut se faire à partir de la crête iliaque, des os de la face, des plateaux tibiaux ou encore du péroné.

L'autogreffe présente de nombreux avantages qui justifient sa large utilisation en chirurgie de reconstruction^{3,4}. Elle n'engendre pas de réaction de rejet. Elle possède un fort potentiel ostéogénique conféré par sa structure et la présence de cellules et de facteurs ostéogéniques⁵. Ses propriétés mécaniques seront dépendantes de sa densité osseuse. En revanche, le prélèvement de l'autogreffe nécessite un second site opératoire, à l'origine d'une morbidité importante de type douleur post-opératoire, hernies iliaques, hémorragies^{6,7}. D'un point de vue pratique, ce type d'opération nécessite la prolongation du temps d'anesthésie et de l'intervention chirurgicale augmentant alors le risque de complications⁷. Par ailleurs, le volume de la greffe osseuse prélevée est généralement limité à 20 cm³ et peu de cellules présentes au sein du greffon survivraient à l'intervention. Avant de recourir à l'autogreffe, le chirurgien est amené à prendre en compte non seulement les limites de l'autogreffe mais aussi le patient, et ce malgré l'efficacité reconnue de l'autogreffe. Par exemple, face à un patient jeune, les chirurgiens essaient de trouver des alternatives à l'autogreffe de façon à ne pas compromettre son capital osseux.

I.2 Greffe allogénique

En Europe, les allogreffes osseuses représentent 26% des applications cliniques regroupant majoritairement les reprises de prothèses articulaires afin de combler les pertes de substances liées à une ostéolyse environnante. L'allogreffe peut également être envisagée pour le comblement de grandes pertes de substance osseuse notamment après exérèse de tumeurs⁴³.

L'avantage de l'allogreffe est de ne pas nécessiter de second site opératoire réduisant ainsi les complications postopératoires. De plus, compte tenu de ses bonnes propriétés mécaniques, elle permet une mise en charge rapide. Le prélèvement peut se faire sur donneur vivant lors d'arthroplastie de hanche ou sur donneur cadavérique, après consentement éclairé de ces derniers. Lors d'une demande d'allogreffe, le chirurgien doit estimer la quantité nécessaire de têtes fémorales en tenant compte des contraintes de prix et de disponibilité. Il s'agit, contrairement à l'autogreffe, d'implanter du tissu osseux mort dont la présence de collagène exogène ralentit la résorption du greffon. De ce fait, l'efficacité de l'allogreffe est limitée par rapport à l'autogreffe. Par ailleurs, pour diminuer l'immunogénicité, l'allogreffe doit être

congelée ou lyophilisée, non sans risque d'affecter les caractéristiques mécaniques du greffon. Au même titre que les autres dons d'organes, les prélèvements osseux obéissent aux mêmes critères sanitaires (recherche et inactivation de virus et de bactéries). Par contre, ces traitements (thermiques, chimiques, stérilisation...) altèrent considérablement les propriétés ostéoconductrices des allogreffes⁴⁴. Ainsi, l'ensemble des problèmes rencontrés explique que la proportion d'utilisation des allogreffes tende à diminuer vis-à-vis des alternatives chirurgicales.

I.3 Xénogreffe

L'utilisation de matériaux d'origine biologique hétérologue a été proposée comme une alternative. Les premières xénogreffes conservaient leur phase organique à l'origine notamment de réactions immunologiques excluant tout espoir de succès. Les xénogreffes actuellement commercialisées, d'origine bovine ou corallienne, subissent de nombreux traitements chimique et thermique. Cependant, malgré ces améliorations, les xénogreffes sont de moins en moins utilisées compte tenu du risque biologique persistant et de leur faible efficacité.

II Les substituts osseux

Les limites des greffes osseuses biologiques ont amené les chercheurs à développer des matériaux synthétiques utilisés dans les arthrodèses et lors des pertes de substances cavitaires^{7,45}. Même si, dans certaines indications^{7,45}, l'efficacité des substituts osseux est comparable à l'autogreffe, cette dernière demeure le protocole de référence.

II.1 Propriétés d'un substitut osseux « idéal »

Le cahier des charges d'un substitut osseux comprend trois propriétés biologiques fondamentales : la biocompatibilité, la bioactivité, et la biofonctionnalité⁴⁶⁻⁴⁹. Les biomatériaux osseux doivent être biocompatibles c'est-à-dire être bien tolérés vis-à-vis des tissus environnants. L'objectif des substituts osseux est de reconstruire de l'os. Pour cela, ils doivent être ostéoconducteurs et résorbables, l'ensemble de ces propriétés définissant en partie la bioactivité^{3,48}. L'ostéoconduction⁵⁰ est la propriété passive d'un matériau à promouvoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir des berges du tissu hôte. L'ostéoconduction se distingue de l'ostéoinduction qui se définit comme la

capacité d'un matériau à recruter les cellules souches environnantes et à induire leur différenciation pour synthétiser une matrice ostéoïde⁵¹. Cette notion ne fait pas l'objet d'un consensus scientifique. Certains auteurs émettent l'hypothèse du rôle prépondérant joué par la présence de facteurs ostéogéniques à la surface du biomatériau⁵². Aucune étude n'a permis, pour l'instant, de vérifier cette hypothèse. Par ailleurs, les substituts osseux doivent présenter une biofonctionnalité partielle puisqu'elle ne concerne que l'aspect mécanique de l'os et temporaire c'est à dire avant la néoformation osseuse. Cet os nouvellement formé doit remplir les trois fonctions essentiels du tissu osseux : mécanique, métabolique et hématopoïétique.

Pour développer des substituts osseux qui répondent aux exigences définies précédemment, les chercheurs se sont tournés vers trois familles de composés, les sulfates de calcium (plâtre de Paris), les carbonates de calcium et les phosphates de calcium. Notre propos se focalisera sur les phosphates de calcium qui sont les plus largement utilisés en chirurgie de comblement osseux. Les phases minérales des vertébrés sont composées de phosphates de calcium ce qui explique que ces derniers soient parfaitement bien tolérés par l'organisme hôte. Dès leur implantation, les fluides biologiques initient une dissolution du matériau suivie par la précipitation d'une couche d'apatite carbonatée à leur surface. La continuité ainsi obtenue entre les deux tissus, le tissu osseux hôte et le biomatériau, favorise la colonisation cellulaire et la formation du tissu osseux. La résorption et la dégradation cellulaire du substitut osseux résultent de l'action concomitante des ostéoclastes et des macrophages⁵³⁻⁵⁶. La vitesse de résorption du matériau et celle de néoformation du tissu osseux doivent être idéalement proches afin d'assurer la stabilité de l'interface⁵⁷. Les qualités biologiques, chimiques et mécaniques de la liaison obtenue à l'interface os/substitut sont donc primordiales pour assurer l'ostéointégration de l'implant⁵⁸. Les phosphates de calcium remplissent deux conditions du cahier des charges des substituts osseux, la biocompatibilité et la bioactivité.

II.2 Céramiques phosphocalciques

Les phosphates de calcium sont des poudres qui nécessitent une mise en forme avant leur implantation. De façon historique, la mise en forme choisie est la céramique et au cours de cette étape, les chimistes ont cherché à former deux types de porosité : la microporosité et la macroporosité. La microporosité correspond aux pores existant entre les cristaux de

phosphates de calcium dont le diamètre est inférieur à 10 μ m. Cette microporosité est déterminée par la température de frittage du matériau et intervient dans les phénomènes d'échanges ioniques avec les fluides. La macroporosité correspond aux pores dont le diamètre est supérieur à 100 μ m. Elle résulte de l'action de porogènes incorporés lors de la synthèse de la céramique (naphtalène, sucre, billes de polymère, fibres...). La macroporosité est un facteur déterminant pour l'invasion vasculaire et la colonisation cellulaire, cependant elle compromet la résistance mécanique de l'implant^{59,60}. Un paramètre chimique caractérise également les céramiques, il s'agit du rapport atomique calcium/phosphore (Ca/P). Ce rapport est généralement inversement proportionnel aux taux de dissolution de la céramique et donc à sa résorption⁶¹. D'autres facteurs tels que la surface spécifique, la taille des cristaux, influent sur la solubilité des phosphates de calcium.

La céramisation des phosphates de calcium nécessite un traitement thermique autour de 1000°C. A cette température, seules deux espèces phosphocalciques sont stables, l'hydroxyapatite (HA) et le β -phosphate tricalcique (β -TCP)⁶⁰.

II.2.1 L'hydroxyapatite

Le terme « apatite » définit une famille de solides ioniques cristallisant dans le système hexagonal et de formule générale $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$ avec Me : cation bivalent ; XO_4 : anion trivalent ; Y : anion monovalent. Les apatites phosphocalciques biologiques sont généralement décrites à partir de l'HA. L'HA est caractérisée par sa formule brute $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ et par un rapport Ca/P égal à 10/6 (1,67). L'HA présente la même structure cristalline que l'apatite biologique mais sa composition chimique est différente. En effet, l'HA est un composé synthétique stoechiométrique peu soluble, tandis que l'apatite biologique est polysubstituée, lacunaire ce qui la rend plus soluble que l'HA⁴⁸. Sous l'effet des fluides biologiques, les cristaux d'apatite croissent de façon épitaxiale⁶².

II.2.2 Le phosphate tricalcique bêta

Le TCP (tri calcique phosphate) a pour formule brute $Ca_3(PO_4)_2$ et un rapport Ca/P atomique égal à 1,5. Il existe sous deux formes allotropiques, le β -TCP stable jusqu'à 1125°C et l' α -TCP stable entre 1125 et 1430°C. Le β -TCP cristallise dans un système rhomboédrique. Comparativement à l'HA, ce matériau présente une solubilité et une biodégradation supérieures. Par contre, sa structure rhomboédrique ralentit la croissance épitaxiale des cristaux d'apatite.

II.2.3 Les biphasés

Comme leur nom l'indique, ces matériaux sont constitués de deux phases, HA et β -TCP⁵⁹. Ils portent aussi la terminologie anglo-saxonne BCP (biphasic calcium phosphate). Ils combinent ainsi les propriétés physico-chimiques et biologiques de chacune des phases. Leur efficacité clinique résulte de leur propriétés d'ostéoconduction et de résorbabilité, cette dernière étant proportionnelle au taux de β -TCP. La présence d'HA favorise la croissance épitaxiale des cristaux d'apatite.

II.3 Ciment phosphocalcique

Les nouvelles techniques se veulent être le moins invasive possible afin de limiter les risques chirurgicaux, les complications postopératoires, le temps de convalescence et donc le coût global de l'hospitalisation. Dans ce contexte, les substituts osseux injectables, avec notamment les ciments phosphocalciques (CPC), ont été développés^{60,63,64}. Le concept des CPC fut initialement introduit par LeGeros et *al* en 1982⁶⁵.

II.3.1 Principe d'obtention

Un matériau type ciment est généralement constitué de deux phases, solide et liquide, qui, une fois mélangées, forment une pâte visqueuse⁶⁶. Lors de la réaction de prise, cette pâte acquiert une certaine plasticité qui durant la prise confère au ciment ses propriétés mécaniques initiales qui augmentent progressivement jusqu'à l'obtention d'une masse solide.

Plus précisément, la phase solide est constituée d'un ou plusieurs composés à base de phosphate et/ou de calcium. Quant à la phase liquide, il peut s'agir d'eau pure, d'une solution acide, basique ou tamponnée (par exemple : à base de phosphates solubles) et pouvant notamment contenir des fluorures, de l'alginate ou du chitosane. Elle joue le rôle de milieu réactionnel permettant la dissolution (lente ou rapide) des réactifs de départ jusqu'à sursaturation de la solution formant ainsi un précipité contenant des cristaux. La prise du ciment se fait par enchevêtrement de ces cristaux et se fait sous conditions ambiantes. Le temps de durcissement d'un ciment dépend notamment de la granulométrie de la poudre, la quantité de phase aqueuse, la présence de cristaux.

Les ciments phosphocalciques (CPC) peuvent être classés selon les produits de départ utilisés ou selon le produit final obtenu une fois la prise complète⁶⁷ :

- ✓ Les ciments apatitiques : pour lesquels le produit final est de l'hydroxyapatite stœchiométrique (Ca/P=1,67) ou déficiente en calcium qui a un rapport Ca/P compris entre 1,5 et 1,67.
- ✓ Les ciments octacalciques : pour lesquels le produit final est de l'OCP (octacalcium phosphate) avec un rapport Ca/P de 1,33)
- ✓ Les ciments dicalciques : le produit final est la brushite (phosphate de calcium dicalcique) avec un rapport Ca/P=1
- ✓ Les ciments carbonatoapatitiques : pour lesquels le produit final est de la dahllite, hydroxyapatite contenant de 4 à 6% en poids de carbonate

II.3.2 Les applications cliniques

Brown et Chow ont envisagé plusieurs applications cliniques sur ce type de matériau^{68,69} :

En orthopédie :

- ✓ Cyphoplastie - Vertébroplastie
- ✓ Fixation des endoprothèses,
- ✓ Comblement des cavités osseuses après exérèse tumorale).

En chirurgies dentaire et maxillo-faciale :

- ✓ Comblement des alvéoles et augmentation des crêtes osseuses
- ✓ Fixation des implants buccaux
- ✓ Accélération de la régénération d'os perdu en raison de la maladie parodontale.
- ✓ Base de recouvrement de cavité pour protéger la pulpe ou couvrir la pulpe exposée

II.3.3 Conclusion

Les CPC offrent une excellente biocompatibilité et sont ostéoconducteurs⁷⁰. Du fait de leur texture pâteuse, ils peuvent être injectés et adopter parfaitement la forme de la cavité osseuse à combler, aussi complexe soit elle. Leur caractère injectable⁷¹ rend possible des actes chirurgicaux mini invasifs jugés moins agressifs que les approches traditionnelles.

Cependant, les CPC présentent trois principaux problèmes qui se situent au niveau de leur temps de prise, de leur résistance mécanique et de leurs propriétés biologiques finales. Les

temps de prise longs des CPC rendent leurs applications cliniques délicates. De plus, la résistance mécanique des CPC, même si elle est supérieure aux céramiques, demeure cependant éloignée de celle de l'os. Enfin, l'absence de macroporosité entraîne, *in vivo*, une résorption seulement superficielle du matériau sans colonisation cellulaire en profondeur⁷². Les recherches se focalisent actuellement sur la formation de macroporosité au sein de ces ciments, avec notamment l'incorporation de cristaux solubles tels que le sucre ou le mannitol ; ces cristaux après durcissement du matériau stocké dans l'eau s'éliminent pour laisser place à des pores. Une autre méthode consiste à créer des macropores dans le matériau en additionnant de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) dans la poudre de départ. Ces techniques n'ont pas augmenté d'une façon considérable la macroporosité des CPC et la résistance à la compression est restée médiocre rendant ces ciments non applicables dans les sites soumis à des contraintes importantes^{68,73,74}.

D'une façon générale, l'efficacité des biomatériaux phosphocalciques dans des indications cliniques définies ainsi que leur excellente biocompatibilité ont conduit les chercheurs à les envisager comme vecteurs de molécules organiques.

Chapitre 3 LES SYSTEMES COMBINES

« Calcium phosphate biomaterials as a bone drug delivery system : a review »

E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, JM. Bouler

Drug Delivery Today, préparé pour soumission

Partie B

DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES A LIBERATION DE PRINCIPES ACTIFS A PARTIR DE PHOSPHATES DE CALCIUM

Article 1

« Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption *in vitro* »

C. Faucheux, **E. Verron**, A. Soueidan, S. Josse, MD. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, JM. Bouler, B. Bujoli, J. Guicheux

Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, 89; 46-56

Article 2

« Bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite : *in vivo* bone augmentation in osteoporotic environment »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier , J. Lesoeur, JN Argenson, J. Guicheux, B. Bujoli, J.M. Bouler

Journal of bone mineral research, 2009 (soumission)

Article 3 :

« Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on post-operative pain »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier, H. Le Guen, D. Holopherne, R. Cavagna, JM. Bouler

Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2009 (soumission)

Chapitre 1 SYSTEME A LIBERATION DE BISPHOSPHONATES

L'ostéoporose est une maladie systémique touchant le squelette. La fracture ostéoporotique est la conséquence la plus redoutée puisqu'elle peut, selon les circonstances, compromettre le pronostic vital du patient. Les bisphosphonates font partie des traitements systémiques largement indiqués dans la prévention des fractures ostéoporotiques^{13,75}.

La première partie de ce chapitre, exclusivement bibliographique, permettra de situer le contexte clinique de notre étude en rappelant quelques données épidémiologiques et cliniques sur les fractures ostéoporotiques et quels en sont les traitements. Parmi les traitements disponibles, nous insisterons sur les bisphosphonates en présentant leurs intérêts cliniques mais aussi leurs principales limites.

Une des stratégies actuelles est de consolider localement les sites osseux fragilisés par l'ostéoporose. Dans ce contexte, nous avons développé des systèmes à libération de bisphosphonates à partir de substituts osseux. Cette approche expérimentale sera détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

A. LE CONTEXTE CLINIQUE : LES FRACTURES OSTÉOPOROTIQUES

I Généralités

L'ostéoporose est une maladie systémique du squelette caractérisée par une masse osseuse faible et une détérioration de la microarchitecture osseuse conduisant à une fragilité osseuse et une augmentation du risque fracturaire ⁷⁶.

L'ostéoporose primaire se distingue de l'ostéoporose secondaire.

L'ostéoporose primaire est liée aux modifications hormonales rencontrées au cours de la ménopause et du vieillissement. Elle atteint essentiellement l'os spongieux. Elle se traduit cliniquement par des tassements vertébraux ou des fractures de l'avant bras. L'ostéoporose postménopausique est une affection fréquente touchant plus de la moitié des femmes après 50 ans.

L'ostéoporose secondaire touche les 2 sexes (plus fréquente chez l'homme) généralement après 70 ans. Ses étiologies sont variées : endocriniennes (hypercorticisme, hypogonadisme, hyperthyroïdie), métaboliques (maladies digestives), toxiques (alcool, tabac) ou génétiques (maladie de Lobstein...). Elle touche préférentiellement l'os cortical de telle sorte qu'elle se manifeste le plus souvent par une fracture du col du fémur.

II Les fractures

II.1 Les principaux sites ostéoporotiques

Tous les sites squelettiques peuvent être l'objet de fractures ostéoporotiques, à quelques exceptions près : le crâne, le rachis cervical, les mains. Il s'agit de fractures liées à une moindre résistance osseuse et donc survenant suite à un traumatisme léger ou sans traumatisme. Le traumatisme peut être une simple chute de sa hauteur ou parfois un traumatisme direct minime (choc du gril costal contre un meuble provoquant une fracture costale, accès de toux ou d'éternuement à l'origine de fracture vertébrale). Par ailleurs, il ne faut pas négliger les fractures par insuffisance osseuse survenant sans traumatisme.

Les trois fractures ostéoporotiques les plus fréquemment rencontrées, dans 77% des cas, sont par ordre d'âge de survenue⁷⁷⁻⁷⁹(figure 6) :

- la fracture du poignet (âge moyen 57 ans) représentant environ 18% des trois sites touchés ;
- la fracture vertébrale (âge moyen 67 ans) correspondant à 57% des trois sites touchés ;
- la fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF) (âge moyen 82 ans) représentant environ 25% des trois sites touchés.

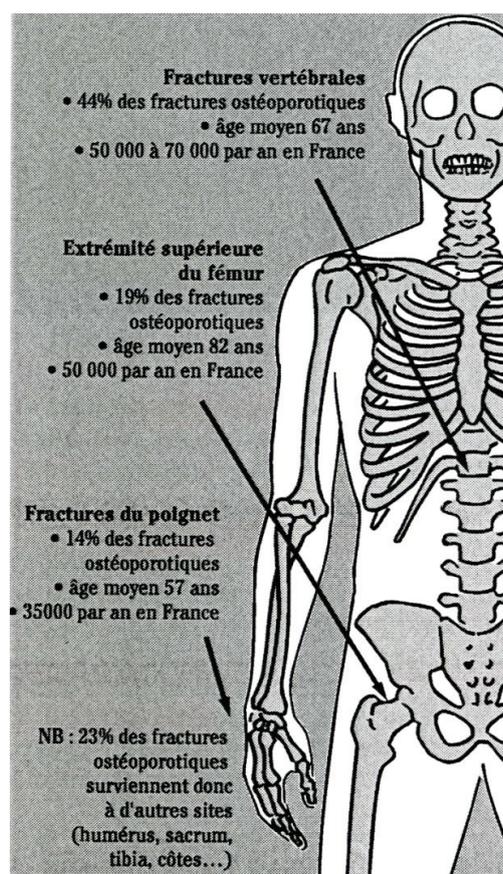


Figure 6: Localisation des fractures ostéoporotiques⁷⁸

II.1.1 Fracture du radius distal

La fracture de l'extrémité inférieure du poignet^{12,77-80}, appelée fracture de Pouteau-Colles, représente 80% des fractures du poignet. Il s'agit de fractures précoces. Ces fractures surviennent à la suite d'une simple chute vers l'avant, la main étant positionnée pour amortir la chute. Son incidence est évaluée entre 30 000 et 40 000 cas par an en France chez la femme. Cette fracture doit être considérée comme un signe d'alarme et inciter à réaliser une

ostéodensitométrie osseuse. Celle-ci révèle une ostéoporose dans 8 à 9 cas sur 10. La survenue de fracture du poignet multiplie le risque de fracture du col du fémur entre 1,5 et 2 et ce 25 ans après la première fracture.

La fracture du poignet n'est pas associée à une augmentation de la mortalité mais elle peut néanmoins avoir des conséquences fonctionnelles non négligeables. Les patients souffrent d'algodystrophie après ce type de fracture, avec douleur, tension, raideur et troubles vasomoteurs de la main. La plupart de ces symptômes disparaissent après un ou deux ans, la raideur persiste plus longtemps. Seulement 50% des patients déclarent avoir une bonne récupération fonctionnelle au bout d'un an^{81,82} et 16% des femmes, âgées entre 45 et 54 ans, nécessitent une hospitalisation.

II.1.2 Fracture vertébrale

L'incidence réelle des fractures vertébrales (FV) est difficile à définir car seulement 1/3 de ces fractures sont diagnostiquées^{78,83}. Elles ont longtemps été considérées comme asymptomatiques. En réalité, les symptômes sont considérés comme insuffisants pour réaliser des radiographies du rachis. Le syndrome fracturaire vertébral est parfois bruyant, invalidant et très algique (environ 1/3 des cas) ; *a contrario*, il peut se résumer à une lombalgie aiguë pendant quelques jours. Il n'existe pas de consensus concernant les critères radiologiques à utiliser pour définir une fracture vertébrale à partir de radiographies du rachis dorsal ou lombaire. Cependant, les déformations vertébrales observées sur des radiographies permettent de distinguer les déformations liées à des fractures de celles liées à la survenue d'une arthrose vertébrale. La majorité des fractures vertébrales symptomatiques surviennent à l'occasion d'activités banales de la vie quotidienne (par exemple, soulever un objet lourd). Un quart seulement sont consécutives à une chute⁸⁴.

La conséquence des fractures vertébrales la plus souvent décrite est le mal de dos. La survenue d'une fracture vertébrale peut s'accompagner d'une douleur aiguë, profonde et localisée qui disparaît généralement en 4 à 6 semaines⁸². Une douleur subaiguë peut cependant persister au-delà de 6 mois après la fracture. Une fois déformée, la vertèbre ne reprend plus sa forme initiale. Il existe différents grades de FV ostéoporotique selon la gravité de la déformation vertébrale : enfoncement d'un plateau, des deux plateaux, aspect cunéiforme, déformation en galette⁷⁸. La morbidité à long terme correspond à l'existence de déformations vertébrales multiples et sévères à l'origine de cyphose voire de scoliose et de

douleurs chroniques très handicapantes pour le patient^{85,86}. A ce stade, chaque tassement vertébral est associé à une perte de taille de 1 à 2 cm en moyenne par vertèbre atteinte. Concernant la mortalité suite à une fracture vertébrale, le taux de survie 5 ans après le diagnostic correspond à 80% du taux attendu selon l'âge et le sexe⁸⁷. La mortalité augmente progressivement au cours du temps.

La FV est un signe d'appel en ce sens qu'elle constitue un facteur de risque de fracture fémorale et de re-fracture vertébrale. Il s'agit d'un phénomène de « cascade fracturaire »⁸⁸. Une femme ayant eu une FV a trois fois plus de risque de fracture incidente. De plus, elle aura une nouvelle fracture vertébrale dans l'année qui suit dans 20% des cas.

II.1.3 La fracture de l'extrémité supérieure du fémur

En France, on dénombre près de 50 000 nouveaux cas chaque année⁷⁸. La fracture de l'extrémité supérieure du fémur (FESF) touche essentiellement la personne âgée (âge moyen 82 ans). Son incidence augmente de façon exponentielle après 70 ans et surtout après 75 ans. Elle est pratiquement nulle avant 60 ans. A âge égal, l'incidence des FESF est environ deux fois plus élevée chez la femme que chez l'homme. La France se situe dans une position européenne intermédiaire en terme de taux d'incidence ; les taux les plus élevés étant observés dans les pays nordiques et a contrario, les taux les plus bas sont rencontrés dans les pays méditerranéens. L'ensoleillement peut probablement expliquer ce gradient nord-sud.

La FESF survient généralement lors d'une chute sur le côté, les capacités musculaires et proprioceptives ne permettant plus d'amortir la chute par les mains⁷⁷⁻⁷⁹. Le risque de chute augmente avec l'âge. Les personnes âgées présentent généralement une mauvaise vision, des troubles de l'équilibre aggravés avec leurs traitements médicamenteux. Dans de rares cas, la chute est consécutive à la fracture.

Elle représente la forme la plus grave des fractures ostéoporotiques. Elle peut compromettre l'indépendance des sujets âgés et mettre en jeu le pronostic vital⁸⁹. Environ 1/3 des sujets décèdent dans les 6 mois suivant la FESF⁹⁰. La mortalité des victimes de FESF dans l'année qui suit l'accident est de 10 à 20% plus élevée que celle de sujets de même âge et de même sexe dans la population générale¹². Cependant, il faut modérer la part de mortalité liée exclusivement à la fracture. Ces patients présentent généralement un état de santé initial détérioré qui explique en grande partie l'excès de mortalité observée après l'accident. Un âge avancé, la présence de comorbidités, les manifestations de confusion mentale pendant

l'hospitalisation augmentent le risque de décès après fracture⁸⁰. Un quart des survivants présente une perte de mobilité et d'autonomie importante, qui se traduit par un séjour en institution d'au moins un an (15-25% des cas), ou encore dans 25 à 35% des cas, d'une aide à domicile¹². L'élément clé de la récupération fonctionnelle est la marche⁸². Un an après chirurgie de la hanche, environ 70% des patients ont retrouvé leur capacité initiale de déplacement⁹¹.

II.1.4 Autres fractures ostéoporotiques

D'autres sites peuvent être touchés tels que l'extrémité supérieure de l'humérus, de la cheville, de la diaphyse fémorale, des plateaux tibiaux, des côtes, des branches ilio ou ischio-pubiennes et la mandibule⁷⁷⁻⁷⁹. L'épaisseur de la corticale de la mandibule ainsi que la perte de dents seraient des indicateurs prédictifs de l'ostéoporose^{92,93}. La fréquence de ces sites, bien que difficile à évaluer, est estimée à environ 50 000 par an en France. Ces fractures sont prédictives de la survenue d'autres fractures ostéoporotiques.

II.2 Conséquences économiques

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)⁹⁴, de l'International Osteoporosis Foundation (IOF)⁹⁵, les coûts imputés à l'ostéoporose atteignaient, en 2005, 53 milliards de dollars en Europe, 34 milliards aux Etats-Unis. Le coût est essentiellement dû aux frais d'hospitalisation (62%). Compte tenu de l'allongement de la durée de vie, le problème de l'ostéoporose, déjà préoccupant, risque de s'aggraver dans les années à venir. Dans l'Union Européenne, le nombre de FESF devrait atteindre 970 000 en 2050 et le nombre de lits d'hôpital nécessaires pour les patients atteints de FESF et de FV devrait doubler d'ici 2050⁹⁶.

II.3 Les facteurs de risque

Le terme de facteur de risque s'applique en épidémiologie à « toute variable associée statistiquement à la survenue d'une maladie, cette relation étant généralement de nature étiologique ». L'identification de ces facteurs est essentielle pour diagnostiquer précocement les sujets à haut risque de développer la maladie et ainsi, leur proposer un traitement préventif adapté.

Une densité minérale osseuse (DMO) diminuée est fortement associée à un risque élevé de fracture^{97,98}. Le risque est multiplié par deux pour chaque diminution de la DMO égale à un

écart-type par rapport à la moyenne des femmes de même âge. Divers facteurs génétiques, comportementaux, médicaux et environnementaux influencent l'importance de la perte osseuse au cours du vieillissement⁹⁷. En dehors de l'âge et du sexe, les principaux facteurs de risque d'une DMO basse ou d'une perte osseuse sont : l'origine ethnique (sujets caucasiens), les antécédents familiaux de fractures, un faible indice de masse corporel (IMC), un faible apport alimentaire en calcium, une carence en vitamine D, une consommation excessive d'alcool, de tabac, et de café, la sédentarité, certains traitements (en particulier une corticothérapie prolongée)^{97 77-79}.

La diminution de la DMO bien que déterminant majeur du risque fracturaire ne suffit pas à expliquer complètement la survenue de fractures. Avec l'âge, les modifications de la microarchitecture sont souvent impliquées dans le processus de fragilisation osseuse et donc dans le développement de fractures⁹⁷. Face à ce constat, des techniques de mesure de fragilité osseuse se sont développées, notamment celles basées sur la propagation d'ondes ultrasonores à travers l'os. L'intérêt des paramètres mesurés, tels que la vitesse du son ou encore son atténuation à travers l'os, est qu'ils reflètent la DMO ainsi que l'élasticité et la structure de l'os⁹⁹. De nombreuses études ont montré que ces paramètres ultrasonores mesurés sont prédictifs des fractures^{100,101}. Les appareils ultrasons sont relativement simples d'utilisation, potentiellement utilisables en ambulatoire, et moins onéreux que les appareils d'ostéodensitométrie classiques. Cependant, ces techniques restent très largement sous exploitées car jugées peu reproductibles.

D'autres facteurs de risque de fracture indépendants de la DMO sont évoqués. Il s'agit de facteurs de risque liés aux chutes. L'étiologie de ces chutes est variée : une mauvaise acuité visuelle, une mobilité réduite ou l'inactivité physique, un environnement inadapté (tout ce qui peut provoquer des chutes au domicile), une diminution de la force musculaire (difficulté à monter les escaliers, baisse de la force d'extension du genou et/ou de la force du quadriceps), les traitements sédatifs ou affectant l'équilibre. Le type de chute, la taille ou la longueur du fémur sont également des facteurs de risque de fracture indépendants de la densité osseuse¹⁰².

Comme décrit précédemment, les antécédents de fractures sont des éléments à considérer dans l'évaluation du risque fracturaire du patient. De façon générale, les femmes ayant un antécédent de fracture (poignet, vertèbres ou extrémité supérieure du fémur) ont deux fois

plus de risque de développer une nouvelle fracture par rapport aux femmes sans antécédent fracturaire¹⁰³. Ces femmes présentent à la base une DMO faible.

L'ensemble de ces facteurs de risque sert de base pour l'évaluation du risque individuel de fracture.

II.4 Diagnostic

Différents outils ont été proposés pour évaluer à l'échelon individuel le risque de fracture¹⁰⁴ afin d'instaurer, le plus précocement possible, un traitement osseux préventif. Le diagnostic repose sur plusieurs examens : la mesure de la DMO, l'anamnèse, l'exploration biologique et des examens radiologiques^{77-79,97}.

II.4.1 Mesure de la DMO

Actuellement, la mesure de la DMO est l'élément clé pour décider de la mise en route d'un traitement anti ostéoporotique. La mesure de la DMO par ostéodensitométrie établit la classification suivante valable chez la femme de race blanche^{78,79,97,105}:

- normale : une valeur de DMO différant de moins d'un écart type de la moyenne de référence de l'adulte jeune (T score >-1)
- masse osseuse faible (ostéopénie) : une valeur de DMO différant de plus d'un écart type de la moyenne de l'adulte jeune mais de moins de 2,5 écarts types de cette valeur ($-1 < \text{T score} < -2,5$)
- ostéoporose: une valeur de DMO inférieure de 2,5 écarts-types ou davantage de la moyenne de l'adulte jeune (T score $\leq -2,5$)
- ostéoporose grave (ostéoporose confirmée) : une valeur de DMO inférieure de 2,5 écarts types ou davantage de la moyenne de l'adulte jeune et coexistant avec une ou plusieurs fractures.

II.4.2 Anamnèse et examen clinique

Il faut rester prudent quant à l'interprétation de la DMO. En effet, le risque de fracture, pour un niveau donné de DMO, varie en fonction de l'ensemble des facteurs de risques évoqués précédemment. Par conséquent, à l'échelon individuel, la stratégie diagnostique la plus adaptée doit privilégier l'identification et la hiérarchisation des facteurs de risque ou des situations à risque d'ostéoporose recueillis durant l'anamnèse. L'OMS a développé un nouvel outil dénommé « FRAX » qui aide le praticien dans son diagnostic.

Le FRAX a été établi à partir de 9 cohortes de populations réparties dans le monde représentant 46 340 femmes et hommes. Les algorithmes du FRAX donnent une probabilité sur 10 ans d'une fracture de la hanche ou d'une fracture majeure ostéoporotique (fracture clinique du rachis, de l'avant bras, de la hanche, de l'humérus). Ce modèle, proposé par Kanis¹⁰⁶ permet de calculer rapidement le risque individuel de fracture en tenant compte de différentes données individuelles :

- âge, compris entre 40-90ans ;
- sexe ;
- IMC ;
- notion de fracture antérieure à l'âge adulte, non traumatique ou résultant d'un traumatisme qui, chez une personne en bonne santé, n'aurait pas provoqué une fracture ;
- antécédent de fracture de hanche chez les parents ;
- le tabagisme ;
- une corticothérapie de plus de trois mois avec une dose quotidienne de corticoïde équivalent prednisone à 7,5mg ;
- une polyarthrite rhumatoïde authentifiée ;
- une ostéoporose secondaire (diabète de type I, ostéogénèse imparfaite chez l'adulte, une hyperthyroïdie ancienne non traitée, une malnutrition chronique, une malabsorption intestinale, maladies hépatiques chroniques ... ;
- une consommation alcoolique excessive.

II.4.3 Exploration biologique

Les principaux examens biologiques réalisés qui permettent d'établir un diagnostic différentiel sont la vitesse de sédimentation (VS), la numération de la formule sanguine (NFS), la calcémie/calciurie, la phosphatémie/phosphaturie, les dosages sanguin et urinaire de la 25-hydroxy vitamine D et de la 1,25-dihydroxy vitamine D, l'électrophorèse des protéines, la créatinémie et le dosage de la TSH (thyroid stimulating thyroid)⁷⁹. En effet, ils permettent d'éliminer certaines causes d'ostéoporoses secondaires, certaines ostéopathies malignes notamment en cas de fractures vertébrales. Les marqueurs biologiques du remodelage osseux (marqueurs peptidiques du collagène de type I, phosphatase acide tartrate résistante, phosphatase alcaline, ostéocalcine...) ne permettent pas d'établir le diagnostic de l'ostéoporose. Néanmoins, ils peuvent, dans certains cas difficiles, aider au diagnostic. Leurs dosages présentent un intérêt dans le suivi thérapeutique de l'ostéoporose puisqu'ils

permettent d'évaluer l'efficacité du traitement proposé au patient et de vérifier l'observance du patient vis-à-vis de son traitement.

II.4.4 Examens radiologiques

Des radiographies standards du rachis de face et de profil sont demandées en cas de rachialgies, de perte de taille ou de cyphose thoracique afin de déceler la présence de fractures vertébrales cliniquement silencieuses⁷⁹.

III Les traitements

L'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) a établi des recommandations concernant le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique¹⁰⁵. Les stratégies thérapeutiques proposées tiennent compte de l'âge, des antécédents personnels de fractures et du résultat de la densitométrie osseuse qui sont considérés comme étant les déterminants essentiels du risque de fracture dans les 5 à 10 années suivantes. Ces choix thérapeutiques s'appliquent aux patientes chez lesquelles les autres causes d'ostéopathie fragilisante (myélome, hyperparathyroïdie...) ont été exclues.

La durée du traitement est à adapter selon :

- le risque de fracture individuel : la durée de traitement sera plus longue lorsque le risque initial est élevé ;

- l'efficacité clinique du traitement : la survenue d'une fracture après la première année de traitement peut être interprétée comme un échec de ce traitement ;

- la tolérance du traitement.

Le suivi clinique du traitement permet d'évaluer l'efficacité du traitement instauré et de vérifier l'observance du traitement par le patient. Selon l'AFSSAPS, des mesures répétées de la DMO ne sont pas recommandées dans le suivi du traitement de l'ostéoporose¹⁰⁵. Elles le deviennent, néanmoins, à la fin du traitement afin de réévaluer le risque éventuel de fracture. Le dosage des marqueurs du remodelage osseux présentent un intérêt dans le suivi du traitement en ce sens qu'une modification à 3 ou 6 mois permet de vérifier l'effet osseux du traitement. D'autres méthodes spécifiques au rachis tiennent compte de la réduction de la

taille liée aux déformations vertébrales. A ce titre, une mesure annuelle de la taille est recommandée.

L'AFSSAPS préconise, dans ces dernières recommandations de janvier 2006, les traitements à instaurer selon l'existence ou non de fracture et la valeur du T-score¹⁰⁵. Les arbres décisionnels suivants aident le clinicien à choisir la stratégie thérapeutique la plus adaptée (figures 7 & 8).

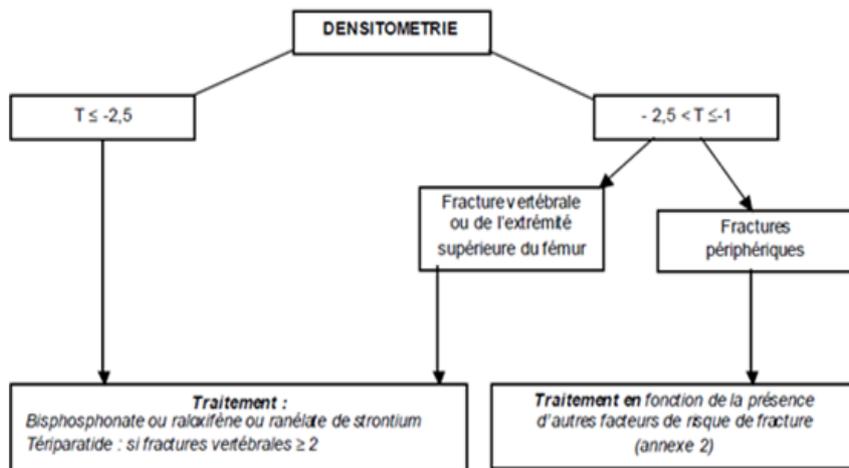
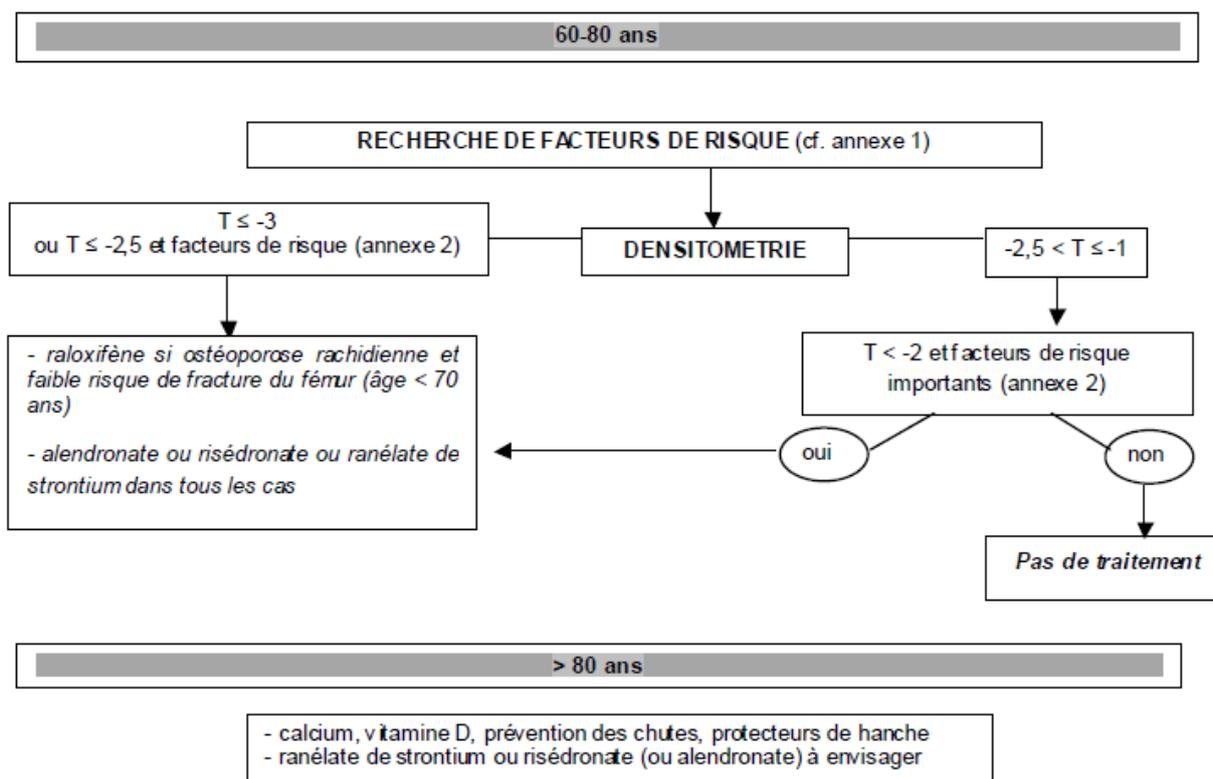


Figure 7 : Stratégie thérapeutique en cas d'ostéoporose post-ménopausique en présence de fracture¹⁰⁵



* Cf. Rapport d'orientation ANAES / Afsaps : « Traitements hormonaux substitutifs de la ménopause », avril 2004.

Figure 8: Stratégie thérapeutique de l'ostéoporose post-ménopausique en l'absence de fracture¹⁰⁵

III.1 Traitements non pharmacologiques

L'AFFSAPS a défini des règles hygiéno-diététiques non spécifiques de la ménopause visant à préserver le capital osseux par un apport suffisant en calcium et vitamine D, le maintien d'une activité physique, l'arrêt du tabac, un niveau d'exposition solaire raisonnable^{105,107}. Par ailleurs, les chutes peuvent être prévenues en sensibilisant et éduquant les personnes âgées. Par exemple, les conseils peuvent porter sur leur tenue vestimentaire, l'aménagement de leur habitat...

III.2 Traitements médicamenteux

De nombreux traitements sont disponibles sur le marché^{79,107-114}, dominé par les bisphosphonates.

III.2.1 Les bisphosphonates

La découverte des BP découle de la description en 1966 par Fleisch et al. des effets des pyrophosphates sur l'hydroxyapatite¹¹⁵. Ils sont utilisés en tant qu'inhibiteur de la résorption osseuse.

III.2.1.1 Relation structure-activité

L'étude relation structure activité (RSA) a fait l'objet de nombreuses publications^{13,116-118}. Les bisphosphonates (figure 9, structure de droite) sont des composés présentant une similarité chimique avec le pyrophosphate inorganique (PPI) (figure 9, structure de gauche).

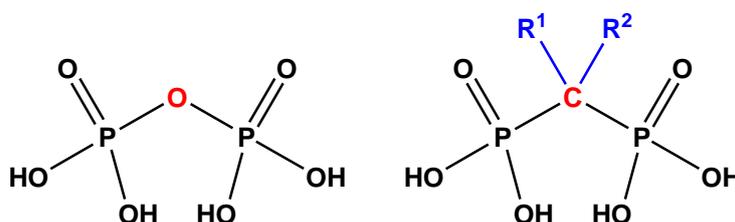
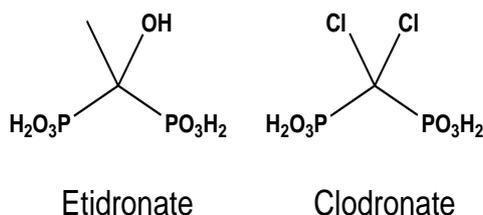


Figure 9: Structure du PPI et d'un bisphosphonate

Les bisphosphonates présentent une résistance accrue à l'hydrolyse enzymatique ou chimique (liaison C-P) par rapport au pyrophosphate (liaison O-P). Les groupements phosphonates permettent aux bisphosphonates de chélater les ions calcium, cette chélation est renforcée dans le cas où R1 est un groupement hydroxyle. Cette structure explique l'affinité largement décrite des bisphosphonates pour le tissu osseux minéralisé. C'est pourquoi, les bisphosphonates sont rapidement éliminés de la circulation sanguine et se fixent sur l'hydroxyapatite au plus près des sites actifs de remodelage. Le groupement R2 semble déterminer la puissance de l'effet anti-résorption. Les bisphosphonates de première génération possèdent un groupement R2 de petite taille comme dans le cas de l'etidronate et du clodronate (figure 10). L'introduction d'une chaîne possédant une amine primaire puis tertiaire et enfin un hétérocycle azoté a augmenté l'effet anti-résorption d'un facteur 1000 à 10000, comme dans le cas du zolédronate par rapport à l'etidronate (figure 10).



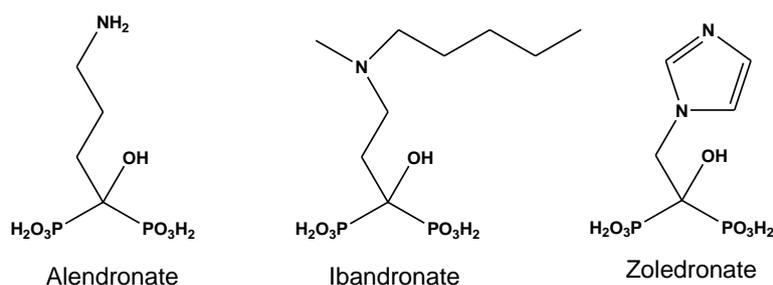


Figure 10 : Structure des principaux bisphosphonates

Deux classes de bisphosphonates ont été distinguées selon leur structure chimique: les non amino bisphosphonates (NABP) et les amino bisphosphonates (ABP)¹¹⁸.

Même si le mécanisme d'internalisation cellulaire n'a pas encore été élucidé, quelques hypothèses ont néanmoins été avancées. Les bisphosphonates peuvent chélater les ions calcium et, de ce fait, se fixent à la surface minérale osseuse. Cette affinité aux ions calcium est réduite en milieu acide, notamment dans les lacunes de résorption, suite à une protonation des groupements phosphonates. Une fois libérés de la matrice minérale, les bisphosphonates vont être internalisés par l'ostéoclaste par un phénomène d'endocytose¹¹⁹. Le mécanisme d'action intracellulaire des bisphosphonates diffère selon la classe chimique.

Concernant le mécanisme d'action des NABP, il n'est pas exclu que l'effet anti résorption soit lié à la prévention de la dissolution des cristaux d'HAP, ce n'est cependant pas le mécanisme principal. L'inhibition de l'activité de résorption est essentiellement due à un effet cellulaire. De nombreuses études décrivent l'effet pro-apoptotique sur les ostéoclastes comme le mécanisme d'action principal des NABP^{13,116,118}. L'induction de l'apoptose des ostéoclastes est liée à la formation de métabolites intracellulaires dont une forme non hydrolysable d'ATP. L'accumulation des métabolites non fonctionnels dans le cytoplasme perturbent le fonctionnement des enzymes ATP dépendantes, parmi elles, l'adénine nucléotide translocase. Cette enzyme contrôle la perméabilité de la membrane mitochondriale. Son inhibition favorise ainsi le passage transitoire d'éléments mitochondriaux tels que le cytochrome c. L'ensemble des bouleversements intracellulaires aboutit à l'apoptose des ostéoclastes.

Les amino-bisphosphonates (ABP) présentent, quant à eux, un mécanisme d'action différent. Ils inhibent l'action de la farnésyl diphosphate synthase (FPP), une des enzymes de la voie des mévalonates impliquée dans la synthèse du cholestérol^{13,116,118}. Par ce mécanisme, les

bisphosphonates préviennent la prénylation des petites protéines G telles que Ras, Rho, Rac, Cdc42 et Rab. Ces protéines sont largement impliquées dans la signalisation intracellulaire de l'ostéoclaste. En effet, elles participent à l'arrangement du cytosquelette, la formation de la bordure en brosse, le trafic de vésicules intracellulaires et l'apoptose.

D'autres mécanismes secondaires sont évoqués comme l'inhibition de la pompe à proton ATP dépendante de type V impliquée dans l'acidification des lacunes de résorption et donc indirectement dans la dissolution du minéral osseux. Les bisphosphonates inhiberaient aussi certaines enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases et les phosphatases. Par ailleurs, les bisphosphonates inhibent une autre catégorie d'enzymes, les tyrosines phosphatases, qui participent à la formation et à l'activité des ostéoclastes.

Un mécanisme indirect d'inhibition de la résorption osseuse a été proposé par Pan et al.¹²⁰. Le zolédronate diminue l'expression membranaire du RANK-L par les ostéoblastes et augmente la sécrétion de l'OPG. La réduction du RANK-L provient de l'augmentation de l'expression d'une enzyme impliquée dans le clivage de RANK-L. Il s'agit de la TACE (TNF activated converting enzyme), enzyme localisée au niveau périnucléaire.

L'effet sur les ostéoblastes reste controversé selon les études. Par exemple, l'alendronate et le risedronate stimulent la formation et l'activité ostéoblastiques¹²¹. L'effet anabolique sur les ostéoblastes serait lié à l'augmentation de l'expression de la BMP-2. Le pamidronate diminue la prolifération des ostéoblastes mais augmente leur activité¹²². Une autre étude a mis en évidence une réduction de la croissance ostéoblastique après traitement aux BP (clodronate, ibandronate, zolédronate, pamidronate)¹²³. Selon une autre étude, les BP favorisent la prolifération et la différenciation des cellules stromales issues de la moelle osseuse humaine¹²⁴. L'ensemble des données de la littérature ne permet pas de conclure à la nature des effets des BP sur les ostéoblastes.

III.2.1.2 Pharmacocinétique

La biodisponibilité par voie orale est faible de l'ordre de 0,7% pour des doses allant de 5 à 40 mg lors de prise à jeun deux heures avant le petit déjeuner^{113,125}. La biodisponibilité devient nulle lors de prise concomitante d'aliments. Il est recommandé de prendre le bisphosphonate au moins ½ heure avant le repas avec un grand verre d'eau faiblement minéralisée en calcium ou magnésium^{113,125}.

L'ensemble des études relatives à la distribution tissulaire des bisphosphonates a été rassemblée dans plusieurs revues¹²⁶⁻¹²⁸. Après une injection IV, l'alendronate radiomarqué se répartit à travers l'ensemble des tissus, minéralisé ou non. A l'exception du rein, le taux d'alendronate dans les tissus non calcifiés diminue rapidement passant de 63% cinq minutes après l'injection à 5% au bout d'une heure, tandis que la concentration osseuse augmente progressivement pour atteindre son pic au bout d'une heure. Cette distribution rapide démontre que les tissus non calcifiés sont exposés peu de temps à l'alendronate. De plus, ces études mettent en évidence une saturation de la fixation osseuse de l'alendronate. La distribution osseuse de l'alendronate n'est pas homogène. Elle se fait préférentiellement dans les sites métaboliquement actifs là où l'HA est largement exposée et donc facilement accessible au principe actif.

III.2.1.3 Efficacité clinique

a. Conséquences sur la DMO et les marqueurs du remodelage osseux

- En traitement de la perte osseuse

Durant la phase III de son étude clinique, l'alendronate administré per os, chez des femmes ostéoporotiques, à la dose journalière de 10mg pendant 3 ans a augmenté la DMO des vertèbres lombaires, du col fémoral et du trochanter respectivement de 8,8%, 5,9% et 7,8% par rapport au placebo¹²⁹. Ces études suggèrent que les augmentations de la masse osseuse des vertèbres et des hanches ne se font pas aux dépens des autres parties du squelette. Tonino et al ont poursuivi l'étude de Libermann et al pendant 7 ans¹³⁰. La DMO mesurée à la hanche atteint un plateau après 2 à 3 ans de traitement. Plusieurs schémas thérapeutiques ont été évalués à savoir 5mg/j et 10mg/j pendant 10 ans et 20mg/j pendant 5 ans chez des femmes ostéoporotiques¹³¹. Le schéma retenu, 10mg/j pendant 10 ans, augmente la DMO de 13,7% au niveau lombaire, de 10,3% au niveau du trochanter, de 5,4% au niveau du col fémoral et de 6,7% au niveau du fémur proximal. Des gains inférieurs ont été obtenus avec une prise journalière de 5mg. Quant au 3^{ème} schéma, l'arrêt du traitement s'accompagne d'une perte graduelle de l'effet osseux en terme de DMO et de marqueurs biochimiques du remodelage osseux. Schnitzer et al ont comparé l'effet de 70mg d'alendronate hebdomadaire versus 10mg alendronate journalier¹³². L'effet densitométrique au rachis, au fémur et au squelette complet est comparable selon les deux protocoles thérapeutiques.

L'effet du zolédronate en injection IV a été évalué sur la DMO et les marqueurs du remaniement cellulaire osseux dans l'ostéoporose postménopausique¹³³. Les patientes ménopausées ont reçu une dose totale annuelle de 4mg, répartie en une ou deux injections. Les auteurs ont observé des gains de DMO dans le groupe traité avec du zolédronate supérieurs de 4,3 à 5,1% en site lombaire à ceux observés dans le groupe placebo et supérieurs de 3,1 à 3,5% en site fémoral. Par ailleurs, les marqueurs biochimiques du remodelage osseux ont diminué de façon significative dans le groupe traité. Cette étude pilote a mis en évidence que des injections de zolédronate, espacées jusqu'à un an, présentent une efficacité comparable au traitement per os, en terme de DMO et de remaniement osseux. A partir de ce résultat, il a été envisagé une forme d'administration annuelle dans la prévention des fractures ostéoporotiques, qui a fait l'objet d'essais cliniques avec notamment les essais HORIZON Pivotal Fracture¹³⁴ et HORIZON Recurrent fracture Trial¹³⁵. Par exemple, Devogelaer et al¹³⁶ ont suivi l'efficacité et la tolérance à 5 ans d'une administration annuelle répétée de zoledronate. La posologie de chaque perfusion est de 4mg/an. Là aussi, la DMO a significativement augmenté aussi bien en site lombaire (6,4-9%) qu'en site fémoral (4,9-5,5%). Le taux de CTX sérique chute de plus de 77% chez les patientes après 2 voire 3 cures. Cependant, chez aucune des patientes, il n'a été observé de réduction pérenne du taux de CTX au-dessous des limites inférieures observées chez la femme en pré-ménopause. Il semble que la dose annuelle testée dans cet essai soit insuffisante, justifiant le choix d'une posologie annuelle de 5 mg.

- En prévention de la perte osseuse

Selon l'étude EPIC¹³⁷ menée chez des femmes en début de ménopause, le gain de DMO lombaire et fémorale obtenu sous alendronate se traduit cliniquement par une prévention de la perte osseuse. En estimant à 2% le seuil de variation de DMO permettant de distinguer la variation biologique de l'erreur de mesure, alors il a été observé une nette réduction du pourcentage de femmes traitées ayant une perte osseuse. Seulement 5% de femmes sous alendronate subissent une perte osseuse en 2 ans supérieure à 2%, en site vertébral ou fémoral, par rapport à 43% chez le groupe placebo.

b. Conséquences sur le risque fracturaire

Une première étude appartenant à l'essai « Fracture Intervention Trial » (FIT) a été réalisée chez 2027 patientes ostéoporotiques ayant au moins une fracture vertébrale¹³⁸.

L'administration d'alendronate pendant 3 ans a réduit l'incidence de nouvelles fractures vertébrales de 47%. De plus, une réduction de 51% a été enregistrée concernant l'incidence des fractures de hanche. La deuxième étude de l'essai FIT a été menée pendant 4 ans chez 3066 patientes ayant un T-score < -2 et sans fracture vertébrale préexistante¹³⁹. Des réductions de l'incidence des fractures de la hanche de 56% et vertébrales de 50% ont été observées. Les effets de l'arrêt du traitement ont été évalués 1 an après l'arrêt chez des patientes traitées pendant 1 ou 2 ans. Le niveau de remodelage osseux est retourné progressivement aux valeurs avant traitement. A l'arrêt du traitement, aucune perte ou augmentation accélérée de la masse osseuse n'a été observée.

D'après l'étude de Gallagher et al. réalisée auprès de 44 531 patients sous traitements de bisphosphonates (alendronate et risédronate), on estime que le risque relatif (RR) de FESF est de 0,78 et de 0,85 pour les autres fractures ostéoporotiques. Pour que la réduction soit marquée, les patients doivent être traités pendant au moins 6 mois¹⁴⁰.

L'étude HORIZON Pivotal Fracture rapporte les effets antifracturaires chez 3889 patientes traitées pendant 3 ans avec une injection annuelle de zolédronate¹⁴¹. Les patientes sélectionnées devaient répondre aux critères d'inclusion suivants : T-Score fémoral < -2,5 ou < -1,5 avec au moins 2 fractures vertébrales légères ou une modérée. Une diminution de 77% de l'incidence des fractures vertébrales a été enregistré chez le groupe traité. Les fractures de hanche ont été réduites de 41%.

c. Conséquences sur le taux de mortalité

L'impact des bisphosphonates sur le taux de mortalité après fracture a fait l'objet d'études cliniques. Lyles et al ont démontré le bénéfice clinique apporté par une dose annuelle de zolédronate (5mg) administrée dans les 90 jours qui ont suivi la fracture de hanche¹³⁵. Il en est ressorti une diminution de 28% du risque de mortalité après une première fracture chez le groupe traité. Ce résultat s'explique en partie par la prévention secondaire de fracture liée au traitement. En effet, on enregistre une diminution de 35% du risque fracturaire après traitement. Dans l'ensemble, le traitement a été bien supporté comme le suggère l'absence d'effets secondaires lourds. Cependant, quelques limites sont à prendre en compte notamment concernant l'âge des patients inclus dans cette étude. Les patients sont relativement jeunes par

rapport aux autres études cliniques, et en bonne santé, et ce, malgré leur antécédent de fracture de hanche.

III.2.1.4 Limites du traitement

a. Données pharmacocinétiques

La faible biodisponibilité orale constitue une limite du traitement nécessitant des prises répétées. Compte tenu de la mauvaise tolérance digestive, il est fortement déconseillé d'administrer des doses plus fortes pour contourner cette faible biodisponibilité.

b. Effets secondaires

Les principaux effets indésirables^{113,125} rencontrés sous bisphosphonates sont des troubles digestifs tels que dysphagie (1%), œsophagite, ulcérations œsophagiennes (0,2- 1,5%) et plus rarement sténoses œsophagiennes favorisées par la prise couchée ou avec une faible quantité d'eau¹²⁵. Sont aussi rapportés des douleurs abdominales (6,6%), des ballonnements, constipation (3,1%), diarrhée (3,1%), nausée (3,6%), vomissement (1%)... D'autre part, des douleurs ostéomusculaires (4,1%), des céphalées (2,6%), des réactions cutanées allergiques et des troubles oculaires (rares et réversibles à l'arrêt du traitement) peuvent apparaître. L'incidence des ostéonécroses de la mâchoire (ONM) sous bisphosphonates *per os* est très mal connue et serait estimée à 1 cas sur 100 000 patients-années¹⁴². Quelques publications rapportent ces rares cas d'ONM chez des patients traités par bisphosphonates dans le cadre du traitement de l'ostéoporose^{143,144}.

La tolérance d'un BP sous forme injectable a été étudiée durant l'essai clinique « HORIZON Pivotal Fracture »¹³⁴. Des symptômes de type pseudo grippaux sont apparus immédiatement après l'injection. Cette réaction de phase aiguë s'atténue lors des perfusions ultérieures. D'autre part, deux cas seulement d'ONM ont été répertoriés, un dans chaque groupe (environ 4000 patients/ groupe). Le risque potentiel d'ostéonécrose après injection de bisphosphonates semble donc pour le moment écarté.

c. Observance

- Définitions

L'observance est définie comme la concordance entre le comportement d'une personne vis-à-vis de la prise médicamenteuse et les prescriptions ou recommandations médicales¹⁴⁵. En pratique, l'observance est mesurée selon le ratio de possession du médicament (RPM) c'est-à-

dire le ratio entre le nombre total des jours approvisionnés en médicament/nombre total de journées suivies.

L'adhésion réunit l'observance et la persévérance, durée pendant laquelle le patient prend réellement son traitement, en continu, sans interruption. Le renouvellement des prescriptions en est le meilleur témoin.

La non-observance est un phénomène fréquemment rencontré dans de nombreuses maladies chroniques. A un an, pour diverses raisons, 40-50% des malades arrêtent spontanément leur traitement sans avis médical. 82% des patients restent compliants après 6 mois de traitement de bisphosphonates¹⁴⁶. Au-delà, ce taux chute. Par exemple, seul 41% des femmes traitées poursuivent leur traitement à la fin de la 1^{ère} année et seulement 50% d'entre elles respectent le schéma de prise¹⁴⁷. D'autres études révèlent la même tendance la 1^{ère} année^{140,148}.

- Les répercussions cliniques

La durée et l'observance du traitement sont directement corrélées à l'augmentation de la DMO au niveau vertébral et fémoral ainsi qu'à la diminution des marqueurs métaboliques de la résorption osseuse¹⁴⁹. La DMO s'accroît de 3,8% sous traitement scrupuleusement respecté¹⁵⁰.

L'étude rétrospective sur 5 ans menée par Siris et al a été conduite auprès de 35 537 femmes ménopausées âgées de plus de 45 ans, traitées par bisphosphonates oraux (alendronate, risédronate)¹⁵¹. Elle permet d'établir la relation entre l'adhésion au traitement et le risque de survenue des fractures spécifiques de la maladie. Le degré d'adhésion a été évalué à partir de deux critères, un RPM supérieur à 80% et l'absence d'interruption au-delà de 30 jours. Les auteurs notent que l'observance est mauvaise chez 57% des patientes et que la persévérance au traitement est respectée seulement chez 20% d'entre elles. L'analyse de la relation entre l'observance et l'efficacité clinique montre qu'une observance correspondant à 75% de RPM est requise pour pouvoir tirer un réel bénéfice du traitement. D'autres études confirment l'importance de l'observance du traitement dans la prévention du risque fracturaire. Une étude réalisée sur 2 ans à partir d'une base de donnée de 11 249 patientes atteintes d'ostéoporose indique que celles ayant pris 80% de leur traitement présentent une réduction de 16% du risque fracturaire par rapport aux patientes non compliantes¹⁵². Dans son étude, Blouin a

montré qu'un RPM inférieur à 80% s'accompagne d'une augmentation de 27% du risque de fractures non vertébrales (RR=1,27), ainsi que du risque de FESF (RR=1,28)¹⁵³.

Outre le bénéfice médical, la bonne prise du médicament génère aussi des économies, les coûts annuels de prise en charge étant significativement moindres chez les patients les plus observants. Le coût global de santé a été réduit de 8,9% en cas de persévérance irréprochable au traitement et de 3,5% en cas de bonne observance. Par exemple, une bonne persévérance au traitement s'accompagne d'une réduction de 47% des hospitalisations, ceci se répercutant sur le coût de santé¹⁵⁴.

- Les facteurs

Quelques études rapportent quelles sont les principales raisons invoquées à cette mauvaise observance^{155,156}. Le risque est élevé durant les 6 à 12 premiers mois de traitement. Plusieurs explications ont été proposées. Les effets secondaires imputés au traitement expliquent en grande partie la mauvaise adhérence du traitement par le patient. Les troubles gastrointestinaux sous bisphosphonates amènent les patients à arrêter spontanément leur traitement dans 20% des cas¹⁵⁷. Cependant, 50% des patients qui reprennent leur traitement voient leur symptômes s'arranger au cours du temps¹⁵⁷. Optimiser la tolérance et la biodisponibilité nécessite une administration contraignante du bisphosphonate souvent mal respectée. L'administration doit se faire en position debout 1/2 heure avant les repas avec un grand verre d'eau. Souvent ces patients sont âgés et polymédicamentés, le nombre de médicaments prescrits est inversement proportionnel à l'observance du traitement. Par ailleurs, il s'agit d'une maladie asymptomatique. Il est donc difficile pour le patient de trouver la motivation à suivre scrupuleusement le traitement puisque les améliorations apportées par ce traitement ne sont pas visibles et non ressenties directement par le patient. Enfin, des raisons financières sont invoquées dans des pays ne bénéficiant pas du même régime de sécurité social qu'en France. Pour diminuer le coût mensuel du traitement, les patients adoptent plusieurs choix : ils réduisent leurs doses journalières voire hebdomadaires afin d'allonger la durée du traitement voire ils ne prennent pas leurs prescriptions...

- Les solutions

Plusieurs solutions ont été apportées pour améliorer l'observance et donc *in fine* l'efficacité du traitement. Une amélioration du schéma de prise a été envisagée en remplaçant la dose

quotidienne par une administration hebdomadaire . Une prise hebdomadaire est possible compte tenu des données de pharmacocinétique et du cycle du remodelage osseux. L'efficacité est la même entre un traitement journalier et hebdomadaire¹³². Rabenda et al ont comparé l'adhérence à 12 mois d'un traitement hebdomadaire et journalier¹⁵⁸. Le RPM augmente de 17% lors de prise hebdomadaire. Cette amélioration est intéressante quand on sait qu'une diminution de 1% du RPM entraîne une augmentation du risque de fracture de la hanche de 0,4%. Une publication, rapportant 14 cas de 1998 à 2006, confirme cette tendance¹⁵⁹. Le traitement hebdomadaire est associé à une meilleure compliance ainsi qu'à une meilleure persistance du traitement estimée entre 194 à 269 jours (vs 134-208 jours en traitement journalier). Ces chiffres restent cependant faibles. Une autre approche a été étudiée comparant une dose journalière (25mg/jr) d'ibandronate avec une administration mensuelle (100-150mg)¹⁶⁰. Cette étude révèle une efficacité similaire en terme d'augmentation de DMO (rachis et hanche), de réduction des marqueurs du remodelage osseux. Par contre, elle ne donne pas d'informations sur le risque de fractures¹⁶⁰. Une amélioration de la prise de bisphosphonates a été envisagée chez des patientes intolérantes aux bisphosphonates. Deux schémas de prise leur ont été proposés, une dose orale mensuelle ou 4 injections annuelles d'ibandronate. L'adhérence et la tolérance ont été bonnes pour les deux protocoles¹⁶¹. De même, compte tenu des données cliniquement pertinentes sur la réduction des fractures, l'injection annuelle de zolédronate permettra d'améliorer significativement l'observance du traitement.

III.3 Autres traitements médicamenteux

D'autres traitements de l'ostéoporose existent^{107,110-113,125}.

III.3.1 Traitement hormonal substitutif

En France, un traitement hormonal substitutif (THS) préventif était systématiquement prescrit en l'absence de contre-indication, et sur une durée prolongée, dans le but de soulager les bouffées de chaleur et d'avoir un effet protecteur sur la masse osseuse et éventuellement le système cardiovasculaire. Le THS associe chez les femmes non hystérectomisées un oestrogène et un progestatif pour prévenir le risque de cancer de l'endomètre et chez les femmes hystérectomisées uniquement un oestrogène.

Cependant, en mai 2002, l'étude Women's Health Initiative (WHI) (Writing group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002) a été prématurément interrompue face à une augmentation de l'incidence de cancer du sein, d'accidents cardiovasculaires (infarctus du myocarde) et d'accidents vasculaires cérébraux dans le groupe sous THS¹⁶². Dans cette étude, l'œstrogène était associé à de l'acétate de médroxyprogestérone administré par voie orale. Une autre étude a confirmé une élévation du risque de maladie veineuse thromboembolique. Ce risque ne semble pas exister avec les œstrogènes administrés par voie transdermique¹⁶³. L'étude WHI montre une réduction de 24% du risque total de fractures. La DMO au niveau de la hanche a augmenté de 3,7% après 3 ans de traitement contre un gain de 0,14% dans le groupe placebo. L'effet est légèrement supérieur au niveau des vertèbres et l'amélioration persiste tout au long de l'étude. Le gain existe quels que soient les facteurs de risque d'ostéoporose¹⁶².

L'incidence des cancers de l'ovaire et de l'endomètre ne semble pas augmenter sous traitement¹⁶⁴. En avril 2004, le bras œstrogène seul de cette même étude est également interrompu de façon prématurée devant une augmentation de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux¹⁶⁴.

L'AFSSAPS a donc réagi en réduisant, dans un premier temps en janvier 2003, les indications aux symptômes climatériques et aux facteurs de risque d'ostéoporose. Il était rappelé que la prescription ne devait avoir lieu qu'après évaluation individuelle de la balance bénéfico-risque pour chaque patiente sur une durée la plus courte possible et aux doses minimales efficaces. En mai 2004, l'AFSSAPS a limité les indications du traitement aux symptômes climatériques invalidants sur une durée la plus courte possible et aux doses minimales efficaces.

III.3.2 Le raloxifène

Le raloxifène (Evista®) est indiqué dans le traitement et la prévention de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. En tant que modulateur sélectif de l'activation des récepteurs aux œstrogènes (SERM, selective estrogen receptor modulator), le raloxifène possède des activités agonistes ou antagonistes sélectives sur les tissus sensibles aux œstrogènes. Il agit comme un agoniste sur l'os, partiellement sur le métabolisme du cholestérol (réduction du cholestérol total et du LDL-cholestérol), mais pas sur l'hypothalamus, l'utérus et le sein.

Chez les femmes ménopausées ostéoporotiques, le raloxifène réduit l'incidence des fractures vertébrales, préserve la masse osseuse et augmente la DMO. Dans une étude conduite auprès de 7705 femmes ménopausées d'âge moyen 66 ans ayant une ostéoporose sans ou avec antécédent de fractures, l'administration pendant 3 ans a réduit respectivement l'incidence des fractures vertébrales de 47% et de 31%¹⁶⁵. Le raloxifène ne présente aucun effet sur la réduction des fractures non vertébrales¹⁶⁶. Le traitement n'influence pas significativement le risque d'accidents thromboemboliques. Par ailleurs, le raloxifène n'augmente pas le risque de cancer de l'endomètre ou des ovaires. De plus, le raloxifène ne stimule pas le tissu mammaire confirmant ainsi l'absence d'effet agoniste oestrogénique intrinsèque sur le tissu mammaire.

III.3.3 La calcitonine

La calcitonine est une hormone thyroïdienne hypocalcémiante. Elle réduit de 33% le nombre de fractures vertébrales chez les femmes ménopausées¹⁶⁷. Cependant, au cours de cette étude, seules 30% des femmes ont terminé l'étude ce qui constitue un biais dans les résultats¹⁶⁸.

III.3.4 L'Hormone parathyroïde

L'hormone parathyroïde (PTH) régule le métabolisme phosphocalcique au niveau osseux et rénal. La PTH stimule la formation osseuse, augmente l'absorption intestinale du calcium, la réabsorption tubulaire du calcium et l'élimination rénale du phosphate. Le tériparatide (Forsteo®) représente la séquence active (1-34) de la PTH humaine. Ce médicament est indiqué dans les cas d'ostéoporose post-ménopausique avérée, c'est-à-dire chez des patients présentant une ostéoporose associée à une ou plusieurs fractures vertébrales. Ce traitement permet de réduire l'incidence des fractures vertébrales (65%) et non vertébrales (53%)¹⁶⁹. Preotac® correspond à la forme intégrale de la PTH. Il est actuellement indiqué dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique chez la femme à haut risque de fracture, cependant il fait l'objet d'une délivrance exceptionnelle pour une durée maximale de 18 mois.

III.3.5 Le ranelate de strontium

Le strontium est un élément chimique, présent à l'état de traces dans certains aliments et dans l'eau de boisson. Le strontium présente une forte affinité pour le tissu osseux. Il est essentiellement incorporé dans la couche externe de l'HA. Une plus faible quantité se trouve dans le cristal osseux sans modifier la croissance cristalline¹⁷⁰. Utilisé aux doses

pharmacologiques sous forme de ranélate de strontium, il freine la résorption osseuse tout en stimulant la formation osseuse¹⁷¹. L'étude STRATOS (Strontium ranelate for treatment of osteoporosis) portant sur 353 femmes, traitées pendant 2 ans avec du strontium, a révélé une augmentation significative de la densité osseuse lombaire, une diminution significative du risque relatif de nouveau tassement vertébral¹⁷². Après 4 ans de traitement, le risque de fractures vertébrales a été réduit de 33%¹⁷³. Le ranélate de strontium (Protelos®) bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché européen depuis janvier 2006. Depuis sa commercialisation, 16 cas de DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms), syndrome d'hypersensibilité, ont été rapportés en Europe. Il a engagé le pronostic vital dans 2 des 16 cas. Une lettre d'information envoyée à l'ensemble des professionnels de santé recommande l'arrêt du traitement en cas de survenue d'éruption cutanée.

III.3.6 Les inhibiteurs de RANK-L

L'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine appartenant à la famille des récepteurs du TNF. Elle inhibe la résorption osseuse induite par le RANK-L. L'OPG est sécrétée par divers tissus, notamment les cellules ostéoblastiques. Une dose unique d'OPG administrée en sous-cutané chez des femmes ménopausées permet, à la dose de 3 mg/kg, une réduction de 80% d'un marqueur de résorption osseuse, le NTX¹⁷⁴. Néanmoins, le niveau de résorption initial est récupéré trois mois après l'injection. L'apparition d'anticorps limite le développement pharmaceutique de cette molécule.

Un anticorps anti-RANK-ligand (Denosumab) administré par voie sous-cutané a induit une inhibition marquée et prolongée pendant six mois de la résorption osseuse, associée à une augmentation significative de la DMO, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques intéressantes¹⁷⁵. Les résultats des études cliniques de phase III viennent d'être publiés et indiquent qu'effectivement le Denosumab, à raison de 60mg tous les 6 mois, réduit le risque de fractures vertébrales et non vertébrales¹⁷⁶.

B. ASSOCIATION PHOSPHATES DE CALCIUM- BISPHOSPHONATES

Article 1

« Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption *in vitro* »

C. Faucheux, **E. Verron**, A. Soueidan, S. Josse, MD. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, JM. Bouler, B. Bujoli, J. Guicheux

Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, 89; 46-56

Article 2

« Bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite : *in vivo* bone augmentation in osteoporotic environment »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier , J. Lesoeur, JN Argenson, J. Guicheux, B. Bujoli, J.M. Bouler

Journal of bone mineral research, 2009 (soumission)

Article (en annexe)

« Reaction of Zoledronate with β -Tricalcium Phosphate for the Design Of Potential Drug Device Combined Systems »

H. Roussière, F. Fayon, B. Alonso, T. Rouillon, V. Schnitzler, **E. Verron**, J. Guicheux, M. Petit, D. Massiot, P. Janvier, JM. Bouler, B. Bujoli

Chemistry of Materials 2008;20:182-191.

I Problématique

Considérant l'ensemble des données décrites précédemment, la prévention des fractures ostéoporotiques est un enjeu majeur de santé publique en terme de coûts humains et financiers. La morbidité et la mortalité augmentent considérablement après la survenue des fractures. La prescription de bisphosphonates (BP) permet de réduire le développement de fractures ostéoporotiques. L'ostéoporose étant une maladie systémique du squelette, cette approche systémique n'est donc pas discutable et a toute sa place dans l'arsenal thérapeutique. Cependant la mauvaise observance du traitement par le patient et l'apparition d'effets secondaires freinent l'efficacité clinique des BP.

Par ailleurs, les fractures ostéoporotiques sont essentiellement localisées au niveau du fémur proximal, du rachis et du poignet. Dès lors, renforcer localement ces sites susceptibles de se fracturer peut permettre de mieux prévenir le développement de fractures ostéoporotiques et de réduire ainsi la mortalité qui en résulte. C'est dans ce cadre que se situe notre projet dans lequel nous proposons une approche locale de la prévention des fractures ostéoporotiques. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser les substituts osseux phosphocalciques comme vecteurs d'inhibiteurs de la résorption osseuse, et notamment les BP, compte tenu de leur efficacité clinique largement décrite dans la chapitre précédent. La réactivité chimique entre les solides phosphocalciques et les sels de BP en solution permet trois types d'association mises à profit pour développer des systèmes phosphocalciques combinés. Cette approche locale est doublement intéressante en ce sens que :

-la matrice phosphocalcique implantée en site ostéoporotique renforcera à court terme les propriétés mécaniques de l'os fragilisé et, en tant que substitut osseux, servira de support à la néoformation osseuse qui contribuera au renforcement secondaire du site osseux;

-les BP libérés *in situ* réguleront localement l'hyperactivité ostéoclastique, caractéristique de l'ostéoporose.

Parmi les BP disponibles, notre choix s'est porté sur la dernière génération d'aminoBP, reconnue pour sa puissance d'action, et plus particulièrement sur le zolédronate. Notre équipe a développé un premier système à libération de zolédronate à partir du β -TCP. Le β -TCP fait

partie des substituts osseux phosphocalciques utilisés en chirurgie de reconstruction osseuse. Il s'agit d'une céramique poreuse présentée sous forme de granules ou de blocs. Des travaux antérieurs ont caractérisé le mode d'association des BP sur le β -TCP. Il s'agit d'une précipitation des cristaux de zolédronate de calcium à la surface du β -TCP¹⁷⁷. Le β -TCP permet de libérer du zolédronate à des doses inhibant l'activité de résorption ostéoclastique¹⁷⁸. Néanmoins, à pH physiologique, le β -TCP n'est pas stable. Il évolue en s'hydrolysant sous forme d'apatite, qui devient en mesure de chimisorber le zolédronate en solution rendant les modes d'association et de libération plus complexes à maîtriser. L'instabilité du β -TCP nous a conduits à envisager d'autres vecteurs phosphocalciques des BP.

La CDA est la phase phosphocalcique précurseur des principales céramiques utilisées en chirurgie de reconstruction osseuse (BCP, β -TCP). La taille de ses cristaux lui confère des propriétés rhéologiques intéressantes, qui lui permettent d'être utilisée sous forme injectable, atout considérable pour la chirurgie dite « mini invasive » de reconstruction osseuse. Par ailleurs, contrairement au β -TCP, les apatites sont stables à pH physiologique. Compte tenu de ses caractéristiques physico-chimiques, la CDA nous a semblé être un vecteur des BP plus adapté par rapport au β -TCP. La description du mode d'association chimique du BP avec la CDA a fait l'objet de travaux antérieurs^{177,179}. Le BP est associé à la CDA suivant un processus de chimisorption, correspondant à un échange entre les groupements PO_3^{2-} du BP et les groupements PO_4^{3-} présents à la surface de la phase minérale^{177,179}. Ce processus est observé jusqu'à saturation des sites. Au-delà de la saturation, un complexe cristallin de zolédronate de calcium se forme à la surface de la CDA.

Ces premiers travaux ont démontré qu'il est possible d'associer chimiquement le zolédronate à la CDA. L'étape suivante a donc été de vérifier, qu'une fois associée, la CDA peut libérer le zolédronate à des doses biologiquement actives. Aussi, dans cette première partie nous nous demandés si la CDA est un vecteur adapté pour libérer le zolédronate de façon à inhiber l'activité de résorption ostéoclastique (article 1).

A partir de ces études *in vitro*, l'association CDA-zolédronate semble apporter un effet prometteur en terme d'inhibition de la résorption ostéoclastique et de tolérance vis-à-vis des ostéoblastes. Par ailleurs, la libération de zolédronate à partir de la CDA a été modélisée et de ce fait peut être contrôlée. Bien qu'encourageantes, ces études *in vitro* ne prédisent en rien

l'activité *in vivo* de notre système combiné. Nous nous sommes donc ensuite demandés si les effets bénéfiques *in vitro* de la l'association CDA-zolédronate se traduisent *in vivo* par un renforcement de l'architecture osseuse. Cette question a été abordée dans le deuxième article (article 2).

II Evaluation *in vitro* de la libération contrôlée de bisphosphonates à partir de biomatériaux phosphocalciques (article 1)

Résumé de l'article :

Les biomatériaux phosphocalciques tels que l'apatite déficiente en calcium (CDA) ont été envisagés en tant que vecteurs de bisphosphonates en site osseux. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets biologiques *in vitro* de la CDA chargée avec du zolédronate (CDA-Z), selon un processus de chimisorption. Les spectres RMN du ^{31}P ont confirmé l'incorporation du zolédronate dans la matrice phosphocalcique. En utilisant du zolédronate radiomarqué au ^{14}C , nous avons mis en évidence la libération *in vitro* du zolédronate à partir de la CDA. Nous avons tout d'abord confirmé que le zolédronate réduit le nombre de cellules TRAP+, l'expression du récepteur à la vitronectine, la formation de l'anneau d'actine et l'activité de résorption d'ostéoclastes isolés à partir d'os longs de lapereaux. La CDA-Z et les surnageants recueillis après son incubation diminuent l'activité de résorption ostéoclastique. Enfin, la CDA-Z n'affecte pas la viabilité et l'activité phosphatase alcaline d'ostéoblastes primaires murins. Ces résultats montrent qu'il est possible de charger et de libérer du zolédronate à partir de la CDA. Le zolédronate libéré inhibe l'activité de résorption ostéoclastique sans induire une cytotoxicité vis-à-vis des ostéoblastes. Ainsi, en libérant directement *in situ* les bisphosphonates, notre système combiné pourrait améliorer leur efficacité. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer *in vivo* l'effet antirésorption de notre système combiné.

Article 1

« Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial
inhibits osteoclastic resorption *in vitro* »

C. Faucheux, **E. Verron**, A. Soueidan, S. Josse, MD. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, JM. Bouler,
B. Bujoli, J. Guicheux

Journal of Biomedical Materials Research Part A 2008, 89; 46-56

III Evaluation *in vivo* de la CDA chargée en zolédronate sur le renforcement osseux en site ostéoporotique (article 2)

Résumé de l'article :

Les biomatériaux phosphocalciques ont démontré leur efficacité en chirurgie de reconstruction osseuse. De plus, les bisphosphonates (BP) sont des inhibiteurs de la résorption osseuse largement utilisés dans le traitement de l'ostéoporose. Un biomatériau phosphocalcique combiné avec des BP et injectable a été développé pour renforcer localement un site ostéoporotique en augmentant la fraction volumique osseuse et en améliorant la microarchitecture osseuse. Nos précédentes études *in vitro* ont mis en évidence que la CDA libère des BP à des doses qui inhibent l'activité de résorption ostéoclastique sans induire de cytotoxicité vis-à-vis des ostéoblastes. L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vivo* l'effet de notre système combiné implanté en site fémoral ostéoporotique à l'aide de techniques de microtomographie en 3D, d'études histologiques et d'observations au microscope électronique à balayage (MEB). Pour des raisons éthiques, les premières études *in vivo* ont été réalisées chez la rate ovariectomisée et ont mis en évidence que la CDA-Z apporte un effet significatif sur la microarchitecture osseuse par rapport à la CDA seule. Ensuite, l'implantation de notre dispositif combiné en site fémoral proximal chez la brebis ostéoporotique a entraîné une augmentation de la fraction volumique osseuse et une amélioration de la microarchitecture osseuse de tous les fémurs traités. Ces modifications ont été confirmées par des analyses histologiques et au MEB des implants mettant clairement en évidence la résorption des granules de PCa et la néoformation trabéculaire. Cette approche innovante pourrait être proposée pour la prévention des fractures ostéoporotiques ; ces dernières se localisant préférentiellement au niveau du fémur proximal, des corps vertébraux et du poignet.

Article 2

« Bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite :
in vivo bone augmentation in osteoporotic environment »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier , J. Lesoeur, JN Argenson, J. Guicheux, B. Bujoli, J.M Bouler

Journal of bone mineral research, 2009 (Soumission)

IV Discussion

L'objectif de ces études est de proposer une approche locale pour la prévention des fractures ostéoporotiques. Pour cela, nous avons mis au point des systèmes à libération de bisphosphonates (BP) en utilisant des substituts osseux phosphocalciques. L'affinité des BP pour les phosphates de calcium (CaP) comme l'hydroxyapatite (HA) a été exploitée pour développer des systèmes phosphocalciques combinés avec des BP¹⁸⁰⁻¹⁸⁴. Cette affinité repose sur la capacité des BP à chélater les ions calcium présents à la surface de l'HA. Quelle que soit la forme d'HA utilisée, les BP ont été incorporés dans la céramique suivant un processus d'imprégnation et, la plupart du temps, sans chercher à caractériser l'interaction et à contrôler la libération du BP.

Notre équipe a développé des systèmes à libération de BP à partir d'autres types de phosphates de calcium tels que la CDA (Calcium Deficiente Apatite), précurseur des céramiques (HA, β -TCP et BCP), et le β -TCP (β -Tricalcique Calcium Phosphate). Notre choix s'est porté sur la CDA car elle possède de nombreuses propriétés physico-chimiques sur lesquelles nous nous sommes appuyés pour vectoriser les BP. Parmi elles, nous avons retenu que sa surface spécifique est largement supérieure aux céramiques phosphocalciques. De plus, la structure lacunaire de la CDA rend possible des substitutions ioniques partielles mises à profit pour doper la CDA avec des molécules actives. La taille submicrométrique des cristaux (50-200nm) et l'absence d'interactions fortes entre les grains lui confèrent des propriétés rhéologiques intéressantes, qui permettent d'utiliser la CDA directement sous forme injectable. A contrario, l'étape de frittage des céramiques entraîne la fusion partielle des grains entre eux qui, même une fois broyés et calibrés, demeurent difficilement injectables. Enfin, les ciments apatitiques sont composés de CDA ce qui permet d'envisager de développer une nouvelle génération de dispositifs phosphocalciques combinés en incorporant le BP dans le ciment via la phase CDA. Quant au β -TCP, il est utilisé en chirurgie de reconstruction osseuse comme céramique poreuse sous forme de granules ou de blocs. Il peut être envisagé de réserver cette forme céramique pour le comblement de défauts osseux suite à des exérèses de tumeurs osseuses primitives pour limiter leur récurrence ; ces tumeurs étant également liées à une hyperactivité ostéoclastique. Il présente une réactivité proche de celle décrite avec l'HA et donc une capacité d'adsorption équivalente. Le β -TCP peut être préféré à l'HA si le chirurgien recherche une cinétique de résorption/substitution de la céramique

rapide ; l'HA étant peu résorbable. Ainsi, pour des raisons propres à chacune de ces phases phosphocalciques, nous avons décidé d'utiliser ces PCa pour développer de nouveaux systèmes combinés dont nous avons successivement caractérisé les fonctionnalités physico-chimiques (chargement et libération de BP, absence de dégradation du BP...) et les effets biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons montré que la réactivité chimique entre les PCa et les BP génère des mécanismes d'association qui diffèrent selon la nature du PCa^{177-179,185}. Face à la difficulté de modéliser la libération de BP à partir du β -TCP, notre choix s'est porté vers la CDA. Nous avons mis en évidence que le BP est adsorbé à la surface de la CDA d'une manière originale, il s'agit d'une association chimique correspondant à un échange réversible entre les groupements PO_3^{2-} du BP et les groupements PO_4^{3-} présents à la surface de la CDA^{177,179}. Après avoir caractérisé ce procédé de chimisorption, nous avons modélisé la cinétique de libération du zolédronate par la CDA en utilisant du zolédronate radiomarké au ^{14}C ¹⁸⁵. Il s'agissait ensuite de vérifier qu'après libération, le zolédronate conserve son activité biologique. Pour cela, nous avons étudié les effets cellulaires de notre système combiné « CDA-zolédronate » (article 1).

➤ Quels sont les effets cellulaires de la CDA chargée en zolédronate ?

L'objectif premier de nos études *in vitro* a donc été d'évaluer l'efficacité de notre système combiné sur l'activité de résorption ostéoclastique, qui nous semble être le paramètre biologique le plus pertinent à mesurer. En effet, nous cherchons avant tout à contrôler localement l'hyperactivité ostéoclastique pour limiter la fragilité osseuse des sites préférentiellement touchés par l'ostéoporose. Pour cela, nous avons développé à partir d'un modèle fonctionnel de résorption ostéoclastique un test biologique de l'activité antirésorption de notre système combiné (Unfractionned Rabbit Bone Cells)¹⁸⁶. Au préalable, il a fallu vérifier que notre modèle de résorption ostéoclastique était sensible à l'action du zolédronate. Pour cela, nous avons évalué l'effet du zolédronate sur trois marqueurs ostéoclastiques : le nombre de cellules TRAP+, l'expression du récepteur à la vitronectine et la formation de l'anneau d'actine. Le zolédronate diminue ces trois marqueurs. Par ailleurs, il réduit l'activité de résorption en terme de nombre de lacunes et de surface totale résorbée. Après avoir validé la sensibilité de notre modèle au zolédronate, nous avons étudié l'effet de la CDA chargée en zolédronate (CDA-Z) sur l'activité de résorption ostéoclastique. Nos données indiquent que le

zolédronate libéré à partir de la CDA, estimé environ à 10^{-6} M, conservait son activité biologique.

Cependant, les données de la littérature concernant l'effet des BP sur les ostéoblastes suggèrent que la dose libérée de zolédronate à partir de notre système combiné (10^{-6} M) pourrait affecter la viabilité et l'activité des ostéoblastes^{121-123,187}. Compte tenu de notre objectif clinique qui est de reconstruire et de renforcer l'os en site ostéoporotique, nous devons certes inhiber l'activité de résorption ostéoclastique mais nous devons également, si ce n'est augmenter, préserver au moins l'activité des ostéoblastes de façon à ne pas compromettre la néoformation osseuse. Nous avons donc testé notre système combiné sur des ostéoblastes primaires isolés à partir de calvaria de souris. Dans notre modèle et nos conditions de culture, nous n'avons pas observé d'effet sur la viabilité et l'activité phosphatase alcaline (PAL) des ostéoblastes. Il pourrait être, par la suite, intéressant de regarder l'effet anti-apoptotique du zolédronate libéré à partir de notre système comme cela a été décrit dans la littérature¹⁸⁷. Par ailleurs, nos données concernant l'absence d'effet des BP sur l'activité PAL peuvent apparaître en contradiction avec certaines études de la littérature¹²¹⁻¹²³. Cependant, nous devons prendre en compte que, dans les études en question, les modèles cellulaires et le type de BP testé étaient différents.

Aussi, nos résultats *in vitro* ont montré qu'il est possible de charger et de libérer du zolédronate à partir de la CDA à des doses biologiquement actives *in vitro*. Le zolédronate libéré inhibe l'activité de résorption ostéoclastique sans induire une cytotoxicité vis-à-vis des ostéoblastes. En libérant directement *in situ* les bisphosphonates, notre système combiné pourrait améliorer leur activité anti-ostéoclastique. Bien conscients de la limite des études *in vitro*, ces premiers résultats encourageants devaient cependant être confirmés par des études *in vivo* appropriées.

- Les effets *in vitro* de la CDA-Z se traduisent-ils *in vivo* par un renforcement de l'architecture osseuse ?

Notre objectif clinique étant de renforcer des sites osseux fragilisés par l'ostéoporose, nous avons voulu vérifier si notre dispositif combiné, une fois implanté, était efficace *in vivo* en situation ostéoporotique (article 2). Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé un modèle *in vivo* d'ostéoporose induite par l'ovariectomie de l'animal soumis par la suite à un régime

appauvri en calcium. Les modifications osseuses chez l'animal ont été évaluées par des méthodes classiquement utilisées (coupes histologiques des implants et observation au microscope électronique à balayage, MEB) et des techniques plus innovantes (microtomographie en 3D). Nous avons choisi, dans un premier temps, de valider notre concept chez la rate ovariectomisée qui est considérée comme le modèle de référence de l'ostéoporose par ovariectomie¹⁸⁸⁻¹⁹¹. La perte osseuse est observée 3 semaines après l'ovariectomie. D'un point de vue pratique, l'abord proximal du fémur étant difficile chez le rat, nous avons implanté notre biomatériau (CDA seule ou CDA chargée en zolédronate, (CDA-Z)) en site distal. Conscients de cette limite expérimentale, nous avons tout de même décidé d'utiliser ce modèle car il s'agit d'un modèle d'ostéoporose largement validé et décrit dans la littérature. Par ailleurs, nous avons dû adapter notre biomatériau (granules de CDA et CDA-Z) de façon à le rendre injectable pour favoriser un comblement homogène du fémur distal chez la rate. Le mélange extemporané d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) avec les granules de CDA confère au biomatériau des propriétés d'injectabilité mises à profit lors de ces études *in vivo*. L'analyse de la microarchitecture osseuse associée à des études histologiques ont mis en évidence une efficacité largement significative de l'implant CDA-Z par rapport à la CDA seule. En effet, la CDA chargée en zolédronate améliore considérablement l'ensemble des paramètres microarchitecturaux osseux par rapport à la CDA non chargée. Enfin, au cours de cette expérimentation, nous avons apporté une preuve supplémentaire de l'efficacité de la CDA-Z puisque nous avons observé que l'injection de CDA-Z en site ostéoporotique permet de récupérer la plupart des valeurs histomorphométriques mesurées chez des rates saines (article 2). Compte tenu de l'effet inhibiteur du zolédronate sur la résorption ostéoclastique, nous nous sommes demandés si sa présence au sein de l'implant pouvait avoir des répercussions sur la résorption de la CDA. L'analyse comparative des implants CDA seule et CDA-Z indique que la résorption de la CDA n'est pas modulée à la baisse avec le zolédronate. Par ailleurs, nous avons observé une interface coalescente entre les granules de CDA et l'os ce qui suggère que la libération du zolédronate ne perturbe pas les propriétés ostéoconductrices de la CDA. Ainsi, par ce premier modèle murin, nous avons démontré que les résultats prometteurs obtenus *in vitro* se répercutent *in vivo* par une amélioration de la microarchitecture osseuse dans un environnement ostéoporotique.

Bien que largement décrit dans la littérature, le modèle rat présente cependant des limites qui rendent difficile l'extrapolation à l'Homme. C'est pourquoi, la Food and Drug Administration (FDA) exige que tout traitement de l'ostéoporose après avoir été testé chez un rongeur soit évalué chez un gros mammifère. La brebis ostéoporotique présente des similarités avec l'Homme ostéoporotique en terme de structure osseuse, de métabolisme osseux et de profil hormonal¹⁹²⁻¹⁹⁵. L'ensemble des changements observés au cours de l'ostéoporose fait de la brebis un modèle pertinent. Ainsi, en se rapprochant des conditions pathologiques rencontrées chez l'Homme, nous nous attendions à ce que l'étude chez la brebis nous apporte des preuves plus solides de l'efficacité de notre biomatériau. Par ailleurs, il est, contrairement à la rate, chirurgicalement possible d'implanter chez la brebis notre biomatériau combiné au niveau du fémur proximal, site osseux fréquemment fragilisé lors de l'ostéoporose. Cette approche proximale, pertinente d'un point de vue clinique, a été retenue pour la première étude chez l'Homme.

Compte tenu de la variabilité intra-espèce et d'un effectif plus réduit chez la brebis que chez la rate, nous avons tout d'abord validé l'état ostéoporotique de l'ensemble de nos brebis. Par la suite, l'analyse microtomographique des fémurs traités (CDA-Z) indique une amélioration significative des paramètres osseux morphologiques et topologiques (cf article 2). L'amélioration est telle qu'il n'existe pas de différence significative entre les brebis ovariectomisées traitées et les brebis saines. Ces données renforcent la preuve d'efficacité de notre biomatériau combiné. Des études tendent également à montrer l'efficacité d'une libération locale de BP à partir d'HA sous forme de cylindres^{196,197} ou de revêtements de prothèses^{183,198}, et confortent ainsi nos données. Non seulement notre vecteur phosphocalcique permet de libérer *in situ* des BP mais, en tant que substitut osseux, il permet également de reconstruire de l'os en site ostéoporotique comme l'indique la densification et la néoformation osseuse. La densification osseuse fait appel à une autre notion également importante, la densité minérale osseuse (DMO). La quantification du contenu minéral osseux se fait généralement par absorptiométrie biphotonique. Cette mesure est notamment réalisée dans la zone définie par le triangle de Ward^{199,200 201}. En effet, la grande variabilité des valeurs obtenues en dehors de ce triangle de Ward rend ininterprétable l'analyse. Dans nos échantillons, la présence du sillon de forage et du biomatériau dans le triangle de Ward interfère avec la mesure de la DMO. Or, en excluant du triangle de Ward les zones de forage et du biomatériau, la zone analysée deviendra trop restreinte pour espérer obtenir des données

interprétables et reproductibles. C'est pour ces raisons que la DMO n'a volontairement pas été abordée dans ce travail même si, avec les paramètres microarchitecturaux, elle explique en grande partie la résistance mécanique. Cependant, la fraction volumique osseuse mesurée par le microscanner peut être liée à la DMO en ce sens qu'elle donne des informations sur la quantité de tissu osseux calcifié, et donc implicitement, sur le contenu minéral. Des études *in vivo* ont confirmé l'existence d'une corrélation de certains paramètres de Parfitt (BV/TV, TbN, TbSp et SMI) avec la DMO²⁰² ou encore avec la résistance à la compression²⁰³.

En complément de notre étude, d'autres méthodes d'évaluation pourraient être envisagées telles que les dosages plasmatiques et urinaires des marqueurs du remodelage osseux (CTX et PAL). Bien que le suivi de l'évolution de ces marqueurs soit couramment utilisé en clinique humaine, nos premiers essais chez la brebis tendent à montrer que ces dosages sont difficilement interprétables du fait de la variabilité des mesures. Il est difficile de les corrélérer avec la réponse osseuse. De plus, il serait intéressant par la suite de compléter notre étude en y intégrant des mesures de l'épaisseur de la corticale qui représente un bon indicateur de la résistance mécanique. Par ailleurs, même si l'amélioration des paramètres histomorphométriques et de la fraction volumique osseuse doit probablement s'accompagner d'une augmentation de la résistance mécanique²⁰⁴⁻²⁰⁶ en site ostéoporotique, nous pourrions vérifier cet aspect mécanique sur des fémurs de brebis. La grande variabilité des tests biomécaniques nécessite de répéter les mesures ce qui implique irrémédiablement le sacrifice de nombreuses brebis, difficile à justifier d'un point de vue éthique. La brebis n'est de toute façon pas le modèle le plus adapté pour prédire la résistance mécanique des fémurs humains ; l'anatomie du col du fémur chez la brebis étant différente de chez l'Homme, plus large et moins long. Cet aspect souligne la limite du modèle animal. Il sera plus judicieux d'étudier l'impact biomécanique de notre traitement en suivant l'incidence de la fracture du fémur chez l'Homme.

Bien que validée dans ce modèle, la perte de densité osseuse est moins importante chez la brebis que chez l'Homme. En effet, malgré une réduction significative du volume osseux, les fémurs des brebis ostéoporotiques conservent une structure trabéculaire qui permet de retenir la suspension visqueuse de CDA après injection dans le col fémoral. Chez l'Homme, la disparition des structures trabéculaires nécessite un vecteur ayant des propriétés mécaniques intrinsèques. Afin d'adapter notre vecteur, nous avons décidé de développer un ciment

apatitique injectable dont l'association avec le BP repose sur nos travaux menés préalablement avec la CDA. Après injection, le ciment durcit rapidement *in situ* ce qui lui permet non seulement de rester en place mais aussi d'apporter un renforcement mécanique primaire. Ce type de vecteur pourra également permettre une approche par fémoroplastie sous pression, dérivée de la vertébroplastie, impossible à mettre en œuvre avec la CDA. Récemment, une équipe italienne a développé un ciment apatitique chargé en BP mais selon un procédé d'association différent du nôtre²⁰⁷. Le BP est incorporé directement dans la composante liquide du ciment ce qui limite fortement la quantité de BP intégrable qui empêche alors la réaction de prise du ciment.

Par l'ensemble de nos travaux, notre approche locale semble présenter un intérêt dans le comblement et le renforcement osseux en site ostéoporotique. Les effets observés pourraient suggérer que notre dispositif combiné apporterait un avantage sur l'administration systémique de BP. Par une approche systémique, les BP ralentissent l'amincissement des travées osseuses ostéoporotiques voire participent à leur épaissement. En revanche, les BP seuls ne permettront probablement pas de reformer de l'os, et donc, d'établir des connexions entre les travées osseuses rompues. Nous nous sommes alors demandés comment pouvions nous positionner notre approche locale par rapport à un traitement classique de BP. La comparaison nous paraît difficile à établir pour plusieurs raisons. D'une part, nous apportons une solution différente pour prévenir le développement de fractures. Notre solution est d'injecter un substitut osseux chargé en BP dans un site ostéoporotique de façon à (1) apporter un support phosphocalcique pour une recapitalisation osseuse et (2) libérer *in situ* le BP afin de limiter localement l'hyperactivité ostéoclastique et d'optimiser ainsi l'efficacité du traitement. L'approche systémique est, par définition, plus large et touche l'ensemble des sites osseux. D'autre part, même si nous n'avons pas à l'heure actuelle les éléments de réponse nécessaires pour pouvoir l'affirmer, mais nous ne devrions certainement pas viser les mêmes objectifs en terme de délai vis-à-vis d'un traitement systémique. Si nous voulons comparer ces deux approches, nous devons définir les critères pertinents sur lesquels nous pouvons nous appuyer. Le suivi d'un traitement systémique de BP se fait essentiellement par DXA tous les 2 ans. Dans notre approche locale, la présence du biomatériau rend impossible la mesure de la DMO par DXA. Le dosage des marqueurs du remodelage osseux permettrait de comparer en temps réel ces deux approches chez la brebis. Néanmoins, nous avons constaté que le dosage

présente un intérêt essentiellement durant les trois premiers mois postovariectomie. Par la suite, les taux des marqueurs sembleraient se normaliser¹⁹⁴. Par ailleurs, l'absence de reproductibilité des résultats nécessiterait de grands échantillonnages avant de pouvoir conclure à un effet sur le remodelage osseux¹⁹⁴. De plus, le traitement systémique entraînera des modifications sur plusieurs sites osseux et donc une libération plus importante des marqueurs du remodelage par rapport à notre approche locale qui ne touche qu'un seul site osseux, la comparaison deviendrait alors biaisée. Finalement, la compensation de l'ostéoporose par la brebis limite la durée des études entre 6 et 12 mois. Ce délai est suffisant pour observer des changements osseux avec notre approche locale combinée ; il n'est pas certain qu'elle le soit pour un traitement systémique. Non seulement nous ne nous plaçons pas dans la même stratégie mais nous ne pouvons pas, avec les outils actuellement validés, procéder à une comparaison rigoureuse des deux approches, systémique et locale.

➤ Conclusion

Afin de développer des systèmes à libération de BP, nous avons choisi d'utiliser la CDA comme vecteur phosphocalcique compte tenu de ses propriétés physico-chimiques intéressantes (surface spécifique, structure chimique lacunaire, stabilité en solution...). L'ensemble de nos études démontre que notre système libère du zolédronate qui se traduit *in vivo* par une amélioration de la microarchitecture osseuse dans un environnement ostéoporotique. Ainsi, l'action combinée de notre système (CDA et BP) pourrait renforcer les sites osseux fragilisés lors de l'ostéoporose. Ces résultats encourageants nous ont conduits à envisager des études cliniques pour confirmer chez l'Homme l'efficacité de notre dispositif combiné.

Dans l'optique de développer de nouveaux systèmes combinés osseux, nous nous sommes ensuite intéressés à une autre problématique rencontrée en chirurgie de reconstruction osseuse, la douleur osseuse postopératoire. L'approche analgésique locale que nous proposons fait l'objet du deuxième chapitre de cette même partie.

Chapitre 2 SYSTEME A LIBERATION D'ANESTHESIQUES LOCAUX

L'os est un tissu innervé, de ce fait, il participe à la transmission du message douloureux. La douleur osseuse peut avoir différentes origines, parmi les plus fréquentes, les métastases osseuses et les interventions chirurgicales. Nous nous limiterons dans notre propos à la douleur osseuse postopératoire. Il s'agit d'une douleur initialement périphérique qui se propage jusqu'au système nerveux central. Cette douleur est un handicap majeur pour une reprise fonctionnelle précoce du patient. La gestion de la douleur postopératoire est donc essentielle pour favoriser un retour rapide à l'autonomie du patient.

La première partie de ce travail rappellera les bases physiologiques de la douleur (périphérique et centrale) et quels sont les traitements actuellement proposés, en insistant sur la place qu'occupent les anesthésiques locaux (AL) dans l'arsenal thérapeutique. La prise en charge de la douleur passe par une approche multimodale dans laquelle l'anesthésie locorégionale joue un rôle prépondérant. Notre concept repose sur l'efficacité de cette approche locorégionale. Nous avons ainsi développé un système à libération d'AL à partir de substituts osseux. Notre approche analgésique locale a fait l'objet d'un brevet européen déposé en janvier 2008 et sera détaillée dans la deuxième partie de ce travail (article 3).

A. LE CONTEXTE CLINIQUE :

LA DOULEUR OSSEUSE POSTOPERATOIRE

I Introduction

En chirurgie orthopédique, la douleur postopératoire est une douleur aiguë très marquée durant les 72 premières heures. Le niveau de douleur postopératoire dépend de l'acte chirurgical (tableau 1)²⁰⁸. La chirurgie des articulations est particulièrement douloureuse à la mobilisation. Cette douleur entraîne un alitement prolongé à l'origine de complications sérieuses telles que des thromboses veineuses profondes, des troubles du transit et des infections urinaires. L'objectif est donc de tout mettre en œuvre pour lutter contre une immobilisation prolongée. Une prise en charge de la douleur efficace permet de débiter rapidement une kinésithérapie intensive de façon à améliorer le pronostic fonctionnel du patient. Elle permet également une sortie plus précoce du patient et réduit ainsi non seulement le risque de contracter des infections nosocomiales mais aussi le coût lié à l'hospitalisation.

Tableau 1: Niveau de douleur en chirurgie orthopédique

Type de chirurgie	Douleur au repos (incidence en %)	Douleur à la mobilisation (incidence en %)	Durée moyenne (jour)
Epaule	45-60	60-70	3 [2-6]
Genou	55-65	60-70	3 [2-6]
Hanche	60-70	70-80	3 [2-6]
Pied/main	65-70	50-60	3 [2-6]

II Les dimensions de la douleur

La douleur est définie, selon l'IASP (International Association for the Study of Pain), comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire

réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes évoquant une telle lésion ». On distingue différentes composantes de la douleur : sensori-discriminative, affectivo-émotionnelle, cognitive, comportementale.

La composante sensori-discriminative correspond au décodage du message sensorielle en terme d'intensité, de durée (permanente, brève...), de localisation et de qualité (décharge électrique, piqûre, brûlure...).

Toute douleur s'accompagne d'un retentissement touchant l'affectivité et l'émotion. Il s'agit de la composante affectivo-émotionnelle. Elle dépend de l'état antérieur de l'individu, de l'intensité, de la durée d'une douleur allant d'un état d'angoisse ou d'anxiété à un état dépressif.

La composante cognitive concerne l'ensemble des processus mentaux qui participent au traitement d'informations associées à cette expérience algique. Par exemple, selon que le sujet est centré sur son corps ou occupé à une activité externe, sa perception de la douleur sera plus ou moins grande. Une douleur attribuée à une cause grave sera mal vécue et gérée plus difficilement. C'est en ce sens, que la douleur postopératoire peut être mieux vécue avec une préparation psychologique. Les contextes personnels ou professionnels influencent la manière dont le sujet va vivre sa douleur. Cette composante cognitive intervient probablement dans la pérennisation de certaines douleurs chroniques.

La dimension comportementale est l'expression corporelle (expression du visage, position antalgique, tension faciale, tonus musculaire...) ou verbale (plainte, cri...) de la douleur.

III Innervation de l'os

L'os dispose d'un réseau nerveux composé de fibres nerveuses, myélinisées ou non, impliquées dans la transmission de la douleur. La distribution et la densité de ces fibres nerveuses sont hétérogènes selon les zones de l'os. Le périoste reste le tissu le plus richement innervé, caractérisé par la présence de fibres nerveuses sensitives et sympathiques²⁰⁹. C'est pourquoi, la distorsion du périoste, suite à un traumatisme ou à un acte chirurgical, est une source majeure de douleur osseuse. La moelle osseuse et l'os minéralisé sont eux aussi innervés et donc impliqués dans la genèse de la douleur. Certaines fibres nerveuses du périoste et de l'endoste peuvent pénétrer dans l'os cortical via les canaux de Volkmann ou de

Havers. Le tronc nerveux diaphysaire pénètre dans le canal médullaire²¹⁰. Au niveau de la plaque de croissance (épiphyse, métaphyse des os longs), il y a des fibres nerveuses sensibles et sympathiques. L'ensemble des fibres nerveuses du tissu osseux libèrent des neurotransmetteurs impliqués dans la transmission et l'amplification du message nociceptif

211.

IV Physiologie de la douleur

Comme succinctement décrit précédemment, l'os est un tissu richement innervé. De ce fait, il participe à la transmission de la douleur générée par l'acte chirurgical en lui-même. La transmission du message nociceptif implique des mécanismes électrophysiologiques et neurochimiques. Trois étapes se succèdent :

- l'élaboration d'un influx douloureux au niveau du nocicepteur et sa transmission dans la fibre nerveuse périphérique ;

- le relais et la modulation au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière ;

- l'intégration au niveau du cerveau aboutissant à la formation d'une sensation douloureuse caractérisée par une composante sensori-discriminative et une composante émotionnelle.

IV.1 La douleur périphérique

Le message nociceptif²¹²⁻²¹⁵ naît au niveau des terminaisons libres des fibres nerveuses présentes dans les tissus cutanés, musculaires et osseux. Schématiquement, l'influx douloureux est véhiculé par deux grandes voies :

- l'une correspond à la douleur rapide véhiculée par les fibres A δ , sous groupe des fibres myélinisées comprenant également des fibres α et β , qui sont elles, impliquées dans la transmission d'informations non nociceptives de type mécanique. Les fibres A δ sont responsables de la douleur localisée et précise (diamètre 1-5 μ m ; vitesse de 4 à 30m/s).

- l'autre est celle de la douleur tardive et diffuse véhiculée par les fibres C amyéliniques (diamètre 0,3-1,5 μ m ; vitesse de 0,4 à 2m/s). Elles sont activées par des stimulations mécaniques, thermiques et chimiques. Leurs stimulations répétées induisent un phénomène de sensibilisation qui diminue le seuil d'excitation et augmente l'intensité de la réponse.

Les lésions tissulaires et l'inflammation consécutives à l'acte chirurgical engendrent la production de nombreux médiateurs (figure 11). Cette « soupe inflammatoire » est composée de prostaglandines (PG), cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-8), bradykinine, histamine (Hist), sérotonine (5-HT), substance P (SP), la « calcitonine gene related peptide » (CGRP)... Elle participe à l'activation et surtout à la sensibilisation des nocicepteurs, situés sur les terminaisons libres des fibres nerveuses (A δ et C). Les ions potassium, les ions hydrogène et l'adénosine triphosphate (ATP) issus des cellules lésées ainsi que la bradykinine sont les seules substances dites « excitatrices », les autres étant essentiellement « sensibilisatrices ». Cette sensibilisation des nocicepteurs se caractérise par la baisse de leur seuil de dépolarisation ; ils deviennent alors sensibles à des stimulations de plus faible intensité. Par ailleurs, les terminaisons nerveuses des fibres sensorielles sont protégées par une barrière, le périneurium, qui empêche le passage des grosses molécules et des molécules hydrophiles ou chargées. La rupture de cette barrière, lors de l'inflammation, facilite alors la diffusion de ces molécules et donc la stimulation des fibres sensorielles.

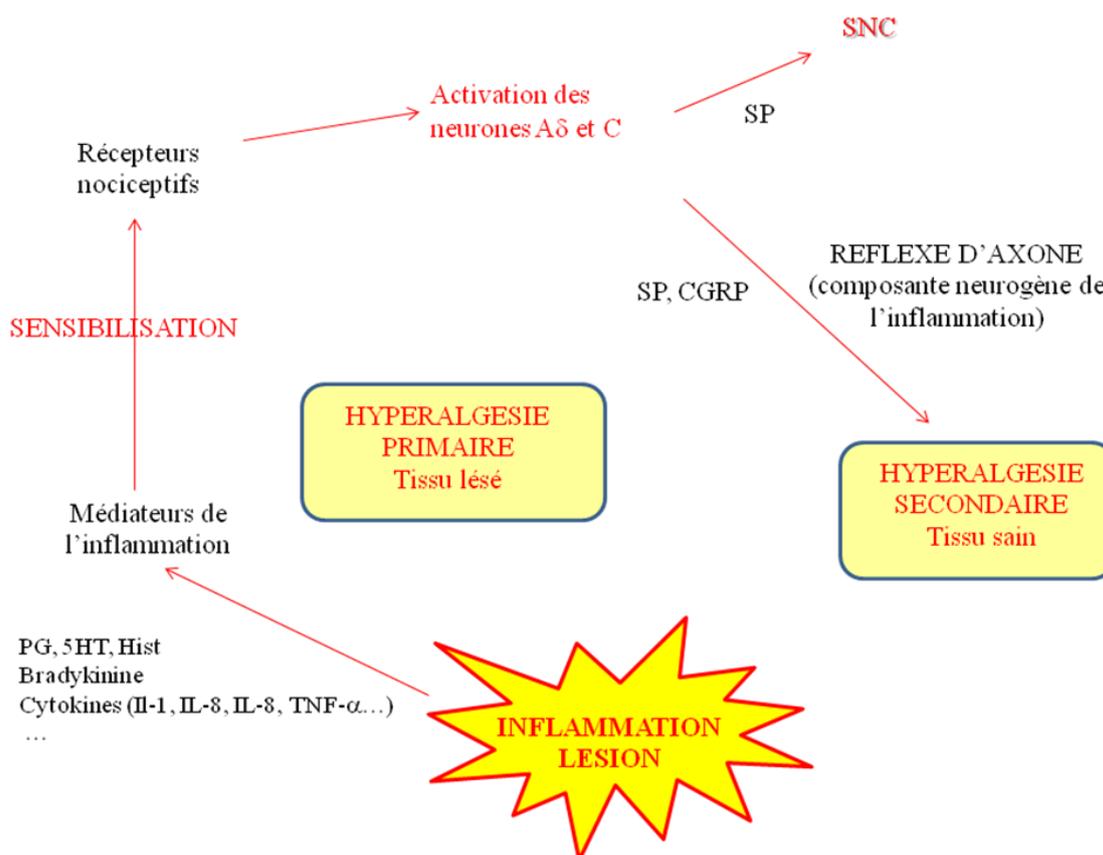


Figure 11 : Amplification du message nociceptif

L'amplification du message est assurée non seulement par les substances libérées au sein du foyer inflammatoire, mais également par le biais d'un recrutement supplémentaire de fibres adjacentes activées ou sensibilisées, notamment par le réflexe d'axone (figure 11). Le réflexe d'axone ou « inflammation neurogène » correspond à la libération en périphérie des neuropeptides algogènes (substance P, CGRP, neurokinine A) présents dans le ganglion rachidien. Ces neuropeptides circulent le long des fibres nociceptives activées. Ils sont libérés au niveau du site lésionnel ainsi qu'à la périphérie de la lésion initiale et vont progressivement atteindre les tissus sains adjacents. Il s'agit de l'hyperalgésie secondaire.

En conclusion, ces phénomènes d'amplification du message nociceptif concerne à la fois le tissu lésé (hyperalgésie primaire) ainsi que les tissus sains qui l'entourent (hyperalgésie secondaire) (figure 11). Ces mécanismes physiopathologiques justifient l'intérêt, dans la prise en charge de la douleur, de bloquer précocement les fibres nociceptives afin d'empêcher l'installation de l'hyperalgésie.

IV.2 Transmission du message nociceptif de la périphérie au cortex cérébral

L'influx nociceptif rejoint le système nerveux central par les racines rachidiennes postérieures de la moelle²¹²⁻²¹⁴. Les fibres A δ et C, qu'elles soient cutanées ou musculaires, se distribuent essentiellement dans les couches superficielles de la corne postérieure de la moelle (figure 12). C'est dans cette région que se localisent les neurones nociceptifs spécifiques qui véhiculent seulement les stimuli douloureux. C'est aussi au niveau de la corne postérieure dorsale que les fibres A δ et C libèrent dans l'espace synaptique des peptides algogènes (substance P, neurokinine A, CGRP, VIP...) et des acides aminés excitateurs AAE (glutamate, aspartate)²¹²⁻²¹⁴. La substance P et le glutamate semblent en partie impliqués dans la transmission du message nociceptif jusqu'aux couches profondes de la corne postérieure, point de départ du faisceau spinothalamique. Les AAE activent le récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) qui transmet très rapidement l'influx nerveux et est donc impliqué dans la transmission physiologique rapide de l'influx nociceptif. D'autres récepteurs aux AAE, tels que les récepteurs NMDA, appelé ainsi car activé par le N-méthyl-D-aspartate, présentent une cinétique d'activation et d'inactivation plus lente que celle des récepteurs AMPA. Une stimulation douloureuse persistante permet leur activation

participant ainsi au maintien de la douleur. Il existe des contrôles inhibiteurs et excitateurs de la corne postérieure de la moelle qui ne seront pas évoqués ici.

Une fois la transmission spinale établie, l'influx monte au niveau du cortex par les voies ascendantes qui comprennent notamment le faisceau spino-thalamique (FST, 1), le faisceau spino-réticulothalamique (FSRT, 2) et le faisceau spino-cervico-thalamique (FSCT, 3) (figure 12). Les fibres du FST sont des fibres A δ qui se projettent dans le cortex sensitif, voie de la sensation. Tandis que les fibres du FSRT sont des fibres C qui se projettent dans les structures limbiques et le cortex frontal, expliquant les composantes émotionnelle et comportementale de la douleur et sa mémorisation.

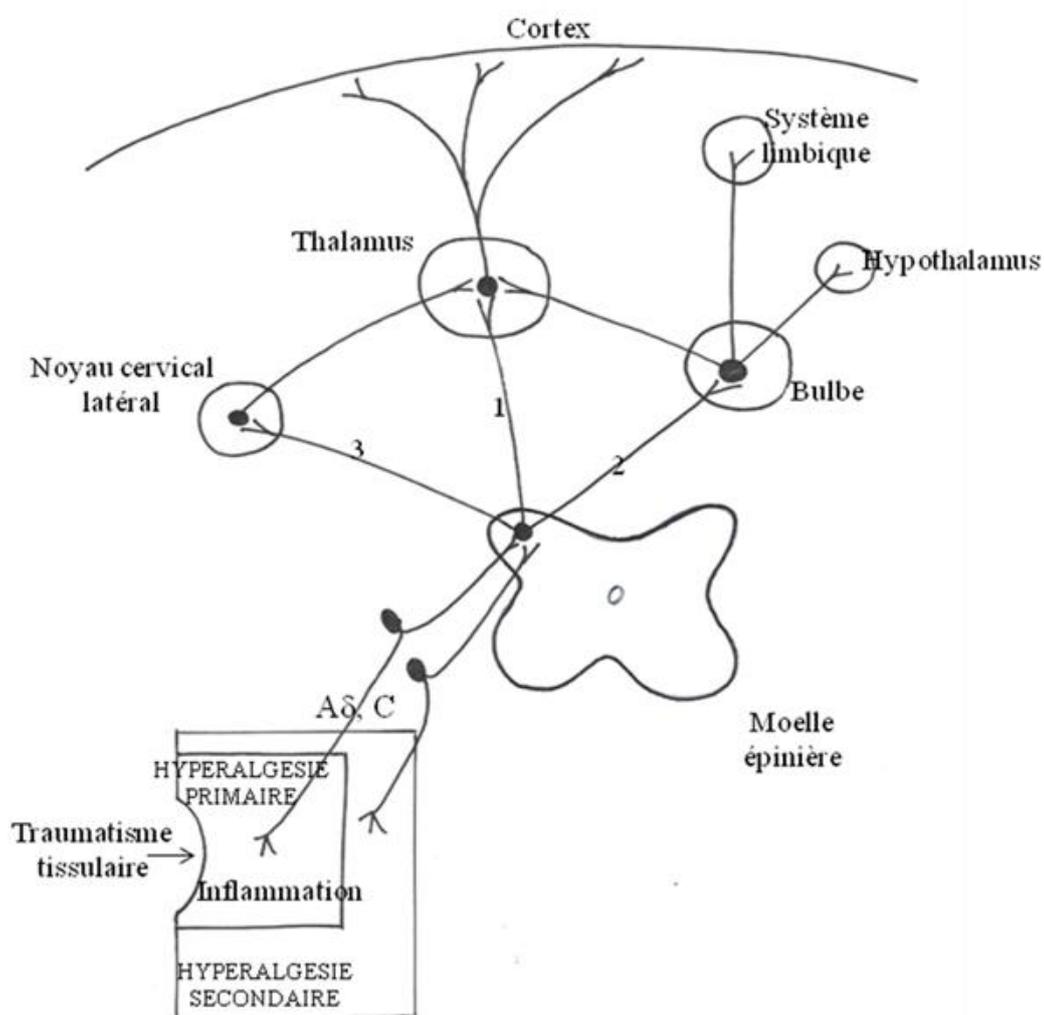


Figure 12 : Voies ascendantes de la douleur

V Description de la douleur postopératoire

➤ La douleur par excès de nociception

Les douleurs postopératoires sont des douleurs par excès de nociception. Comme décrit précédemment, la douleur par excès de nociception correspond à une stimulation excessive des récepteurs périphériques au cours de l'intervention chirurgicale (destruction tissulaire, inflammation, ischémie).

➤ Conséquences physiologiques de la douleur aiguë²¹⁶

A côté de la réponse inflammatoire, on observe une réponse endocrinienne au stress chirurgical. En effet, l'activation du complexe hypothalamohypophysaire entraîne une modification de la synthèse de diverses hormones. La réaction à une agression tissulaire conduit aussi à une activation du système sympathique par l'hypothalamus qui se traduit par une libération de noradrénaline. Cette réponse est considérée comme physiologique. L'ensemble de ces composantes ne sera pas décrit dans ce manuscrit.

➤ Chronicité de la douleur aiguë

La douleur aiguë est un symptôme. Elle est utile en ce sens qu'elle constitue un signe d'appel. Elle participe à la protection de l'intégrité du corps. Les douleurs postopératoires sont des douleurs aiguës généralement prévisibles. Le médecin anesthésiste instaure le traitement généralement pendant l'intervention. Une prise en charge non adaptée de la douleur aiguë va irrémédiablement entraîner sa chronicisation. La douleur chronique s'accompagne d'une hyper-sensibilité à la douleur d'origine sensitive, affective, cognitive et comportementale. Compte tenu de l'ensemble de ses composantes, la prise en charge de la douleur chronique devient difficile. En s'« auto-entretenant », la douleur chronique se répercute tant sur le plan physique, psychique que social de l'individu. La prévention de la chronicisation de la douleur passe par une prise en charge efficace de la douleur aiguë.

VI Prise en charge thérapeutique de la douleur postopératoire

Le traitement^{14,15,125,217} doit apporter une réponse analgésique efficace et rapide, notamment sur les douleurs induites par les mobilisations, afin de commencer rapidement une rééducation fonctionnelle du patient, étroitement liée à un meilleur pronostic clinique.

VI.1 L'analgésie systémique

VI.1.1 Les principales molécules

VI.1.1.1 Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments essentiels pour soulager la douleur postopératoire compte tenu de sa composante inflammatoire. Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX) impliquée dans la synthèse de prostaglandines (PG). Il existe deux isoenzymes, la COX-1, constitutive, et la COX-2, inductible. La COX-1 contrôle la formation de PG qui ont un rôle physiologique (le système digestif, le rein, les bronches et l'hémostase) tandis que la COX-2 est responsable de la synthèse de médiateurs impliqués dans la genèse de la douleur, l'inflammation et la fièvre (figure 13).

Malgré leur efficacité, l'utilisation des AINS reste limitée et contrôlée compte tenu de leurs contre-indications et de leurs effets secondaires. La prostaglandine E2 (PGE2) et la prostacycline (PGI2) sont impliquées dans la production du mucus gastrique, protecteur de la muqueuse gastrique. La toxicité digestive des AINS résulte d'une part, d'effets liés au blocage de la COX-1 et d'autre part, d'une toxicité locale des AINS caractérisée par une destruction directe de l'épithélium. Elle se manifeste par des saignements gastrointestinaux, des perforations et des sténoses. L'inhibition de la synthèse de prostaglandines rénales explique le développement de la néphrotoxicité des AINS. L'inhibition de la COX-1 et de la COX-2 provoque un allongement du temps de saignement par l'intermédiaire de l'action des prostacyclines (COX-1 et COX-2) sur les vaisseaux, et du thromboxane (TX) (COX-1) sur les plaquettes.

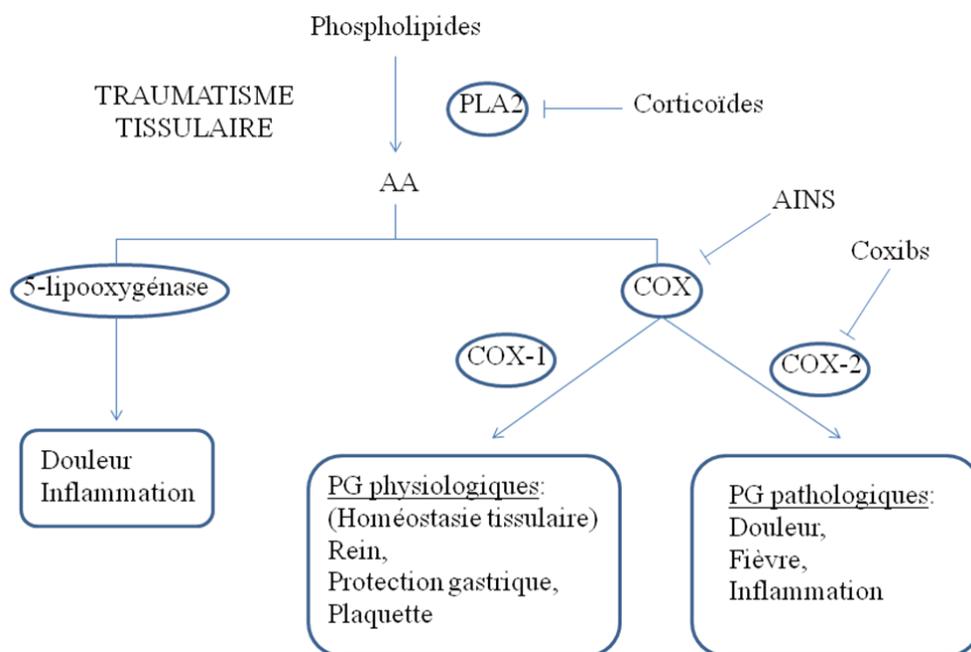


Figure 13 : Cascade inflammatoire

L'acide acétylsalicylique (Aspirine®) présente des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. L'augmentation du risque hémorragique résultante de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par l'aspirine explique que le médecin anesthésiste ne l'utilise pas en postopératoire.

Le kétoprofène (Profenid®) est un AINS dérivé de l'acide arylcarboxylique, du groupe des propioniques qui est très utilisé en IV puis per os en postopératoire. Il possède des propriétés antalgiques périphérique et centrale, antipyrétiques, anti-inflammatoires. Il inhibe de courte durée les fonctions plaquettaires.

Le parécoxib (Dynastat®) est une prodrogue du valdécoxib, inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) appelé plus communément coxib. Malgré cette sélectivité, les coxibs ne sont pas totalement dépourvus d'effets digestifs. Leur intérêt est de ne pas affecter la fonction plaquettaire ce qui a conduit à utiliser préférentiellement les coxibs (parécoxib) en préopératoire afin de réduire le temps de saignement. Cet effet « procoagulant » est particulièrement délétère chez les sujets à risque de complications cardiovasculaires ou thromboemboliques.

De façon générale, les AINS n'accroissent pas la morbidité postopératoire à condition de respecter la posologie et la durée de traitement de 5 jours^{218,219}.

VI.1.1.2 Le paracétamol

Son mécanisme d'action reste encore mal connu. Néanmoins, il est l'antalgique le plus prescrit en postopératoire, à raison de 1g toutes les 6 heures. Son excellente biodisponibilité permet de l'administrer par voie orale. Cependant, prescrit seul, il est souvent inefficace pour soulager la douleur postopératoire en chirurgie orthopédique.

VI.1.1.3 Le nefopam

Le nefopam (Acupan®) est un analgésique central non morphinique. Son mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé cependant il semblerait que ses propriétés antihyperalgésiques résultent de l'inhibition de la libération de glutamate (neuromédiateur algogène).

VI.1.1.4 Les opioïdes faibles

Les opioïdes faibles, tels que le dextropropoxyphène et la codéine, sont le plus souvent utilisés en association avec le paracétamol (Diantalvic®).

Le tramadol (Contramol®, Topalgic®...) est un analgésique central de synthèse dont l'efficacité est due à la synergie d'un effet opioïde et d'un mécanisme monoaminergique central dû à une inhibition de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine. Il est recommandé de l'utiliser en cas d'échec des associations précédentes (niveau II), et avant de recourir aux opioïdes forts. Il s'est avéré être un analgésique efficace lors de chirurgie modérément douloureuse. Par exemple, 100mg de tramadol équivalent à 300 mg de paracétamol associés à 30 mg de codéine. Le risque de dépression respiratoire est quasiment nul.

VI.1.1.5 Les morphiniques

Les morphiniques ont une place cruciale dans la prise en charge globale de la douleur.

L'analgésie provoquée par les morphiniques est intense, constante, dose-dépendante et se manifeste à l'égard de tous les types de douleur. Ils induisent une augmentation des seuils nociceptifs, et ce, indépendamment de la nature du stimulus (chimique, thermique, électrique, pression...). Contrairement aux AINS, ils sont actifs même en l'absence d'une composante inflammatoire de la douleur. Ils se différencient entre eux par leur puissance d'action. La tolérance à l'analgésie, largement décrite avec les morphiniques, oblige les cliniciens à augmenter la posologie pour apporter une analgésie satisfaisante au patient. Cet effet

« antinociceptif » pourrait être lié à des phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie accentués en cas de dose élevée de morphine²²⁰.

L'augmentation des doses de morphine s'accompagne d'effets secondaires lourds qui peuvent devenir très contraignants au quotidien pour le patient. Ils entraînent des troubles digestifs de type constipation, nausées et vomissements appelés *nypo* (nausées et vomissements postopératoires). Seuls les nausées et vomissements transitoires sont traités par Droleptan® et/ou Zophren® et cèdent à la poursuite du traitement. L'effet secondaire le plus grave est la dépression respiratoire d'autant plus redouté chez des sujets naïfs. Les morphiniques dépriment les centres bulbaires impliqués dans la régulation de la fréquence respiratoire avec développement d'une bradypnée et prolongation de l'expiration. Il est fortement recommandé d'augmenter progressivement les doses afin d'éviter le développement de troubles respiratoires. Il existe, fort heureusement, une tolérance pour la dépression respiratoire. D'autres effets indésirables sont observés, la sédation et la dépendance étant les effets les plus redoutés. Compte tenu des effets secondaires des morphiniques, les cliniciens cherchent à diminuer les doses en les associant avec d'autres antalgiques.

L'adaptation des doses passe par la titration intraveineuse (IV) de morphine. Elle consiste à administrer une quantité fractionnée de morphine IV (2 à 3 mg toutes les 5 à 10 min) jusqu'à ce que le patient soit soulagé. La technique de titration doit privilégier les *boli* de petits volume avec des intervalles courts. Cependant, il faut surveiller les doses cumulées de morphine (entre 20 et 30 mg) afin de ne pas provoquer de surdosage. Le relais de la titration IV est assuré par l'administration de morphine en sous-cutanée ou en PCA (patient controlled analgesia).

Des auteurs se sont intéressés à la prise orale de sulfate de morphine, à raison de 20mg toutes les 4 heures, en postopératoire d'arthroplastie de hanche²²¹. Ce schéma d'administration assure une bonne tolérance de la morphine, cependant, l'efficacité analgésique reste limitée si il n'est pas associé à d'autres molécules analgésiques.

VI.1.1.6 La kétamine

La kétamine présente un effet antinociceptif par blocage du canal du récepteur NMDA. Activé par le glutamate (AAE), ce récepteur-canal s'ouvre pour laisser entrer les ions Na^+ et plus massivement les ions Ca^{2+} , favorisant ainsi la transmission synaptique au niveau du SNC.

Le blocage du récepteur NMDA par la kétamine est observé seulement aux fortes doses, c'est-à-dire entre 0,1 à 0,5mg/kg. Par ce mécanisme, la kétamine réduit l'hyperalgésie justifiant ainsi l'intérêt de l'associer avec la morphine afin de prévenir la tolérance à l'analgésie des morphiniques.

VI.1.1.7 Les anesthésiques locaux

a. Effet anesthésique

Les anesthésiques locaux (AL) modifient le potentiel d'action de l'onde nerveuse et sa conduction le long de la fibre nerveuse^{222,223}.

- Notions électrophysiologiques de la conduction nerveuse :

Au repos, il existe une différence de potentiel (ddp) de -70 à -90 mV entre l'intérieur de la cellule, riche en ions potassium et chargée négativement, et l'extérieur de la cellule, riche en ions sodium et chargée positivement. Lors de la dépolarisation membranaire, la perméabilité à l'ion sodium augmente et le potentiel devient positif (+30 mV). Ce courant entrant de sodium dépolarise la membrane ; il s'agit de la phase ascendante du potentiel d'action. Lorsque la membrane se trouve complètement dépolarisée, une modification structurelle du canal sodé le rend imperméable, c'est l'inactivation. Sous l'influence de cette dépolarisation, l'ouverture des canaux potassique provoque une augmentation du courant potassique sortant restaurant de cette manière le potentiel membranaire. Cette phase de repolarisation est marquée par l'inexcitabilité membranaire et correspond à la période réfractaire de la fibre. Il est impossible de générer un second potentiel d'action²²⁴.

Les AL bloquent les canaux sodiques au niveau neuronal altérant ainsi la perméabilité membranaire aux ions sodium. Ils diminuent l'amplitude du potentiel d'action, la vitesse de dépolarisation et augmentent la durée de la période réfractaire. Aux fortes concentrations, ils peuvent bloquer aussi les canaux potassiques et calciques. L'ensemble de ces effets provoque l'interruption de la propagation de l'influx nerveux. Les AL peuvent avoir un effet semblable sur d'autres membranes excitables du cerveau et du myocarde, à l'origine de la toxicité des AL.

- Chronologie de l'effet anesthésique local :

Tous les neurones ne présentent pas la même sensibilité à l'action des AL. Les fibres fines C à conduction lente paraissent plus sensibles que les fibres rapides myélinisées, impliquées dans

la motricité. Ainsi, selon les fibres bloquées, les AL engendrent différents blocs : sympathique, sensitif et moteur. Ces blocs s'installent suivant une certaine chronologie :

-le bloc sympathique responsable de l'arrêt de la conduction neurovégétative ;

-le bloc sensitif induisant l'abolition de la sensibilité douloureuse, tactile, profonde ;

-le bloc moteur inhibant la conduction motrice.

• Relation structure activité :

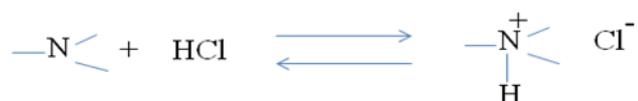
Les AL possèdent un pôle hydrophile et un pôle lipophile séparés par une chaîne intermédiaire.



Le pôle hydrophile est caractérisé par la présence d'un groupe amino. Ainsi, en solution, l'AL existe sous 2 formes, une forme basique, non ionisée (R-NH₂) et une forme acide, ionisée (RNH₃⁺,Cl⁻). La proportion entre ces 2 formes dépend de la constante de dissociation K_a de l'acide conjugué et du pH selon les formules suivantes (1) (2):

$$(1) \text{ pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{Base}]}{[\text{Acide conjugué}]}$$

(2)



La plupart de ces molécules étant des bases faibles, elles se trouvent donc sous forme protonée à pH physiologique. La forme non ionisée, liposoluble, est seule capable de traverser la membrane axonique. Dans la cellule, un nouvel équilibre s'établit où domine la forme ionisée. C'est sous cette forme que les AL bloquent les canaux Na. L'exemple ci-dessous de la lidocaïne illustre l'importance de l'équilibre entre les deux formes, ionisée et non ionisée présentes dans les compartiments (figure 14).

Ex: la lidocaïne

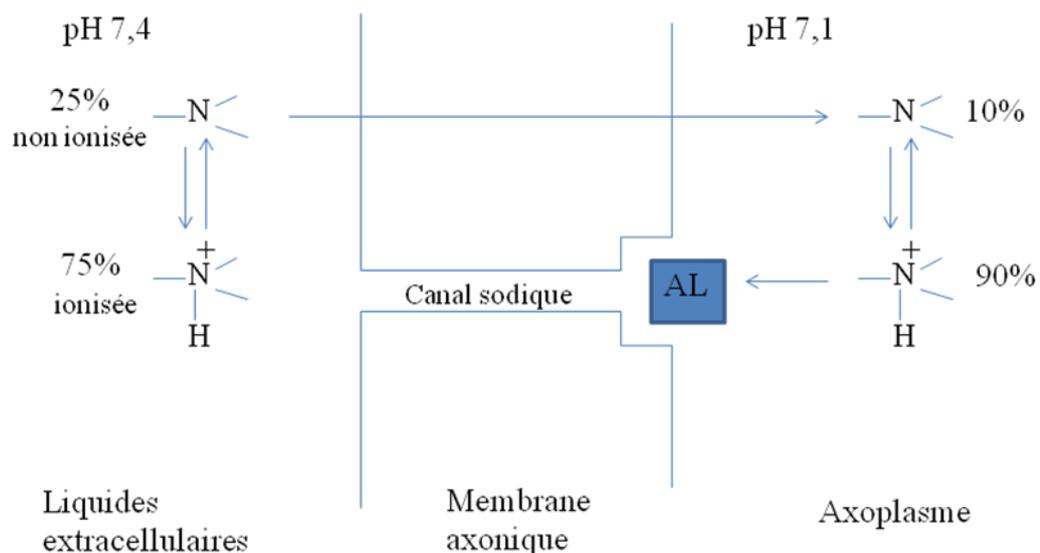


Figure 14 : Blocage du canal Na^+ par la lidocaïne

La chaîne intermédiaire joue un rôle majeur :

-son allongement et sa ramification déterminent la liposolubilité, définie selon le coefficient de partage ;

-la présence d'un groupement ester ou amide intervient dans le métabolisme des AL. Les aminoesters sont moins stables car leur liaison ester est facilement hydrolysable par les cholinestérases plasmatiques. En revanche, les aminoamides présentent une liaison amide plus stable qui est déalkylée lors du métabolisme hépatique.

La liposolubilité et le pKa de l'AL conditionne la vitesse d'installation du bloc nerveux. La durée d'action d'un bloc dépend également de la liposolubilité de l'AL. En effet, de la liposolubilité de l'AL dépendra sa fixation aux protéines plasmatiques et donc indirectement sa durée d'action. Les AL se lient principalement à l'albumine et l'orosomucoïde, protéine de l'inflammation. L'albumine, bien qu'ayant une faible affinité, présente une forte capacité de fixation des AL en raison de son abondance, tandis que l'orosomucoïde, présente en faible concentration dans les conditions physiologiques, a une forte capacité de fixation des AL. Lors de l'inflammation en période postopératoire, l'orosomucoïde augmente très fortement, ce qui se traduit par une concentration sérique élevée en AL. La liposolubilité détermine donc la puissance des AL.

• Principales molécules :

Il existe deux familles d'AL selon leurs structures chimiques :

-la famille des esters : procaine (figure 15), tétracaïne ; elle n'est plus utilisée en chirurgie orthopédique.

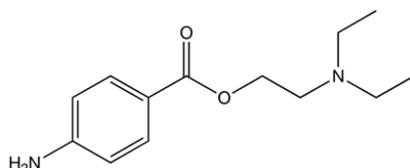


Figure 15 : Structure de la procaine

-la famille des amides : lidocaïne, bupivacaïne (figure 16), lévobupivacaïne, ropivacaïne, mépivacaïne.

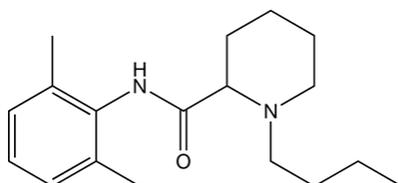


Figure 16 : Structure de la bupivacaïne

Ci-joint un tableau (tableau 2) comparatif des différents AL selon leurs caractéristiques physico-chimiques :

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des anesthésiques locaux

	Procaine	Lidocaïne	Bupivacaïne	Ropivacaïne
Poids moléculaire (PM)	236	234	288	274
pka	8,9	7,8	8,1	8,1
Coefficient de partage	1,7	2,4	346	115
Fixation aux protéines plasmatiques FPP (%)	6	65	95	94
Délai d'action	long	court	intermédiaire	intermédiaire
Durée d'action (en heure)	1	1h30-2	3-3h30	3
Puissance /lidocaïne	0,5	1	4	3,5

b.Effets anti-inflammatoires

Les AL possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent participer à la prévention des complications opératoires^{225,226}. Les AL agissent à toutes les étapes de l'inflammation, notamment l'adhésion, la migration et l'activation leucocytaire. L'effet sur l'adhésion leucocytaire est dose dépendant et observé aux doses cliniques. Cet effet est lié :

- aux blocages des canaux sodiques ;
- à la libération de prostacyclines responsables du détachement des leucocytes de l'endothélium vasculaire ;
- à l'interaction des AL avec certaines molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire.

D'autres effets anti-inflammatoires ont été décrits, tels que l'inhibition de la migration leucocytaire, observée aux doses cliniques. Cet effet est dose dépendant et réversible. De plus, les AL bloquent l'activation leucocytaire. Ils inhibent aussi de façon réversible la phagocytose. L'action anti-inflammatoire des AL résulte également de l'inhibition de la sécrétion de nombreux médiateurs proinflammatoires tels que la prostaglandine PGE2, le leucotriène LtB4, des radicaux libres, des cytokines (IL1, TNF α , IL8...), des enzymes lysosomales, le thomboxane TXB2. Ses effets antiagrégants plaquettaires pourraient atténuer le risque thrombotique.

L'effet AI semblerait être stéréospécifique aux dépens de la forme lévogyre.

c. Pharmacocinétique

La concentration des AL dans le sang dépend de la quantité de produit administrée, la vitesse de résorption vasculaire, la distribution tissulaire et la vitesse de biotransformation et d'excrétion du produit. Des facteurs liés au patient comme l'âge, l'état cardiovasculaire et la fonction hépatique interviennent également.

La résorption vasculaire est déterminée par le site d'administration, l'addition concomitante de vasoconstricteurs et le profil pharmacologique du produit. Les concentrations plasmatiques sont respectivement plus importantes après administration intercostale, périurale, plexique et tronculaire. L'administration concomitante de vasoconstricteur, généralement de l'adrénaline au 1/200 000, diminue la résorption vasculaire et donc les taux plasmatiques de l'AL. Les propriétés vasodilatatrices intrinsèques de l'AL favorisent la résorption vasculaire. Leur liposolubilité majeure leur séquestration dans le tissu adipeux et diminue la fraction libre des

AL. Ces données pharmacocinétiques sont essentielles à intégrer lors de l'utilisation des AL. Du passage systémique dépend la tolérance du traitement.

d.Effets secondaires

Les effets généraux des anesthésiques locaux sont principalement des effets indésirables de type neurotoxique et cardiotoxique. Les symptômes neurologiques précèdent, en règle générale, les signes cardiaques.

- Troubles neurologiques

-Signes et symptômes:

L'action des anesthésiques locaux sur le système nerveux central dépend de leur concentration plasmatique. Les premiers signes cliniques sont mineurs de type somnolence, sensation ébrieuse, céphalées, acouphènes, logorrhée, des paresthésies péri-buccales... Ces signes précèdent la crise convulsive généralisée. Aux très fortes doses, peuvent apparaître une apnée voire un collapsus cardiovasculaire.

-Traitement:

Les convulsions persistantes imposent la protection des voies aériennes par l'intubation qui permet également d'assurer une ventilation adéquate. Elles sont réduites par l'injection IV de diazepam (0,1 mg/kg) ou de thiopenthal (2 mg/kg).

- Troubles cardiovasculaires

-Signes et symptômes:

Les AL bloquent puissamment les canaux sodiques et donc ralentissent la vitesse de conduction intraventriculaire. Le tableau clinique après injection intravasculaire massive induit des perturbations de l'électrocardiogramme (ECG). Ces modifications se traduisent par des troubles du rythme cardiaque à type de tachycardie ventriculaire, de torsade de pointe ou de bradycardie. Ces effets toxiques sont dose-dépendants et surviennent plus souvent avec la bupivacaïne. L'injection intravasculaire de bupivacaïne peut être responsable d'un collapsus cardiovasculaire souvent réfractaire à tout traitement, en raison de la fixation tissulaire importante de ce produit. En revanche, la lévobupivacaïne et la ropivacaïne sont moins toxiques. Dans les rares cas d'arrêt cardiaque lié à l'injection de ropivacaïne, la réanimation a été beaucoup plus simple et rapide qu'elle ne l'est classiquement avec la bupivacaïne^{227,228}.

-Traitement:

Le premier traitement est préventif en réalisant des injections fractionnées et lentes afin de dépister une toxicité débutante. L'hypotension artérielle est corrigée par remplissage vasculaire et administration d'un vasoconstricteur (type adrénaline). Les troubles du rythme peuvent être très difficiles à traiter mais ils se corrigent en général progressivement si l'état hémodynamique du patient est maintenu stable. En cas de trouble du rythme avec bas débit cardiaque ou asystolie, la réanimation cardiorespiratoire doit être longue, car la toxicité cardiaque diminue au fur et à mesure de la redistribution du produit.

- Réactions d'hypersensibilité

-Signes et symptômes

Avec les AL de type amide comme la lidocaïne et la bupivacaïne, de telles manifestations sont exceptionnelles. Néanmoins, plusieurs solutions d'AL contiennent un conservateur, le méthylparaben ; ce composant peut être à l'origine de réactions allergiques croisées chez les sujets sensibilisés à l'acide para-aminobenzoïque. Il peut s'agir de réactions locales (érythème local, urticaire, oedème) ou de réactions systémiques (érythème généralisé, bronchospasme, hypotension, tachycardie, collapsus).

-Traitement

L'hypotension est traitée par remplissage vasculaire, associé à l'injection d'adrénaline (1 mg dans 10 mL) par bolus de 1 mL.

VI.1.2 L'analgésie préventive

Les antalgiques classiques (AINS, morphiniques, paracétamol) ne présentent aucun intérêt dans le cadre d'analgésie préventive. A contrario, la kétamine administrée en peropératoire à la posologie de 0,15mg/kg IV, procure une analgésie plus efficace à 24 heures et permet une épargne morphinique^{229,230}. Adam F et al propose un autre protocole d'administration de la kétamine en IV, à raison de 0,5mg/kg puis 0,3µg/kg/min pendant la chirurgie puis 0,15µg/kg/min pendant les 48 premières heures²³¹. Avec ce protocole, les auteurs observent une épargne morphinique par rapport au groupe placebo améliorant ainsi la tolérance au traitement. En outre, ce protocole favorise une meilleure mobilité de l'articulation et donc une réhabilitation fonctionnelle anticipée.

VI.1.3 L'analgésie multimodale

L'analgésie multimodale permet d'améliorer considérablement la douleur postopératoire. Compte tenu des effets secondaires liés aux morphiniques, les associations proposées d'antalgiques visent à réduire la consommation de morphine. Cependant, les morphiniques sont nécessaires du fait de la puissance de l'analgésie qu'ils procurent.

Les différentes classes médicamenteuses d'antalgiques devront être additives ou synergiques. Quelques exemples d'associations vont être rapidement décrits ci-dessous.

L'association paracétamol-AINS permet d'améliorer l'efficacité de l'analgésie²³²⁻²³⁴. Pour des douleurs modérées, les associations paracétamol-opioïde (tramadol, codéine) permet d'augmenter leur efficacité²³⁴⁻²³⁶. En revanche, en cas de chirurgie majeure, la combinaison du paracétamol seul avec les morphiniques présente peu d'intérêt en terme de réduction de la douleur et des doses de morphine^{237,238}.

D'autres associations avec des AINS sont également envisagées dans cette approche multimodale comme c'est le cas avec le néfopam et le kétoprofène qui entraînent une synergie de leurs effets²³⁹.

L'association néfopam-morphine est intéressante à considérer dans la prise en charge de la douleur. Prescrit seul, 20mg de néfopam exercent un effet analgésique équivalent entre 7 et 10mg de morphine. En association avec la morphine, le nefopam réduit l'utilisation de morphine de 30 à 50%²⁴⁰.

L'association kétamine-morphine est synergique²⁴¹. Cette synergie d'action provient certainement de l'effet préventif de l'hyperalgésie morphinique par la kétamine.

VI.2 L'analgésie locorégionale

L'analgésie locorégionale (ALR) s'intègre dans le schéma de l'analgésie multimodale. L'ALR consiste à déposer au contact de fibres nerveuses un agent qui bloque la conduction de l'influx nerveux d'une façon spécifique, temporaire et réversible.

VI.2.1 Les blocs périméridiques

En chirurgie orthopédique, les blocs nerveux périméridiques avec mise en place de cathéter périméridique représentent la technique analgésique de référence. Le recours à ces techniques permet d'obtenir une analgésie optimale en postopératoire immédiat et entraîne un retour à l'autonomie plus précoce²⁴². L'ALR par cathéter périméridique présente un intérêt supérieur par rapport à la morphine pendant les 72 premières heures postopératoires²⁴³. Par exemple, dans le cadre d'arthroplastie totale de genou, l'ALR procure une meilleure analgésie qu'une analgésie classique permettant une déambulation rapide des patients ainsi qu'une réduction de leur convalescence²⁴². L'efficacité de l'association d'un bloc sciatique continu à un bloc fémoral reste controversée^{243,244}. Selon Richman, elle n'apporte pas de bénéfice en terme de mobilité de l'articulation du genou par rapport à un bloc fémoral seul²⁴³.

Pour résumer, l'analgésie par cathéter nerveux périméridique apporte une baisse de la consommation postopératoire de morphine, une réhabilitation précoce et une réduction de la durée de séjour.

Malgré le réel intérêt de recourir à l'utilisation de blocs nerveux périméridiques continus, des complications infectieuses et neurologiques peuvent apparaître^{245,246}. Par exemple, dans une étude réalisée à partir de 1416 patients²⁴⁷, les auteurs décrivent le développement de complications infectieuses des cathéters périméridiques (<4%), essentiellement à Staphylocoques, quelques cas de lésions neurologiques (0,21%) et un cas d'abcès du psoas. Le risque neurologique peut être d'origine traumatique notamment suite à la lésion d'une structure nerveuse par la pointe de l'aiguille ou encore suite à la compression de fibres nerveuses par l'injection d'un volume important de solution anesthésique dans une gaine ou un espace d'extensibilité limitée²⁴⁸. Le risque hémorragique est surtout redouté lors d'anesthésies périméridiques. Quant au risque infectieux, il doit être évité en respectant les précautions habituelles d'asepsie.

VI.2.2 Les infiltrations

L'innervation de la région opérée étant complexe et variable, l'infiltration directe du site chirurgical est un excellent moyen d'apporter une analgésie large de l'ensemble des tissus concernés. En postopératoire, elle prolonge l'analgésie, réduit et retarde la consommation de morphine et donc les effets secondaires de celle-ci. De nombreuses études ont démontré le

bénéfice clinique de ce type d'administration d'anesthésiques locaux ; cependant, elles se limitent à l'analyse de la douleur dans les premières 24 heures postopératoires^{249,250}. Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité des infiltrations de ropivacaïne pour l'analgésie postopératoire des chirurgies de la hanche, du genou et de l'épaule²⁵¹⁻²⁵³. La douleur postopératoire, au repos et à la mobilisation, est significativement réduite en comparaison à l'administration intraveineuse conjointe de morphine et de kétorolac²⁵¹. Cette approche locale permet également de réduire le recours aux analgésiques et la durée de séjour à l'hôpital.

Ces résultats démontrent l'intérêt d'intégrer les techniques d'infiltration d'AL dans la prise en charge multimodale de la douleur postopératoire. Ces infiltrations assurent des scores de douleurs bas, une diminution de la consommation de morphine, une réduction du séjour hospitalier et une rééducation précoce et efficace des patients marquée par une reprise anticipée de la marche.

VI.2.3 Cas particulier : la douleur après le prélèvement de crête iliaque

L'autogreffe osseuse est la méthode de référence pour la reconstruction de défauts osseux. La crête iliaque constitue le site de prélèvement d'os autologue préférentiellement utilisé²⁵⁴. Sa richesse en tissu spongieux lui confère ses propriétés d'ostéoinduction largement recherchées en chirurgie de reconstruction osseuse.

Le prélèvement de greffon osseux est un geste extrêmement douloureux, la douleur étant généralement plus forte à ce niveau qu'au niveau du site greffé²⁵⁵. Cette morbidité postopératoire peut durer plusieurs mois voire plusieurs années après l'intervention chirurgicale. Par exemple, la douleur au site donneur persiste au-delà de 24 mois chez 31% des patients opérés²⁵⁶. Cependant, certains auteurs estiment que la douleur consécutive au prélèvement osseux est surestimée^{257,258}. Ces contradictions proviennent de la différence des techniques opératoires de prélèvement entre les équipes, du site iliaque prélevé (antérieur vs postérieur...)²⁵⁹, des méthodes d'évaluation de la douleur selon les études²⁵⁴. Un exemple pour appuyer la discordance entre les études : la durée de séjour à l'hôpital. Généralement entre 3,6 et 6 jours, elle peut être réduite à 2 voire 1 jour selon certaines études^{260,261}.

Le prélèvement de greffon osseux est une chirurgie cutanée, musculaire et osseuse qui nécessite donc une analgésie à ces différents niveaux. L'innervation du site du prélèvement

est multiple, elle fait intervenir notamment les nerfs ilioinguinal, iliohypogastrique, subcostal, spinaux... Cette complexité justifie le recours à l'infiltration directe du site de prélèvement. Avant la fin de l'intervention, l'AL est injecté dans la loge de prélèvement puis les muscles sont infiltrés ainsi que le tissu conjonctif environnant en privilégiant les zones richement innervées, comme celles entourant le périoste. Enfin, les berges de la cicatrice sont imbibées d'AL en sous cutané. Par ce procédé, tous les niveaux touchés lors de la chirurgie (cutanée, musculaire, osseux) sont imprégnés d'AL. L'efficacité de l'infiltration, dans le cas de prise d'os iliaque, a été confortée par plusieurs équipes^{262,263}. Elle apporte une analgésie de 6 à 12 heures. La prolongation de l'analgésie par le biais d'un cathéter pendant 48 heures réduit les douleurs postopératoires avec une diminution à trois mois. Ces données confortent l'idée de rechercher la prolongation de la durée d'efficacité des AL pour la prise en charge de la douleur aigue mais aussi pour la prévention de la douleur chronique²⁶⁴.

B. ASSOCIATION PHOSPHATES DE CALCIUM – ANESTHESIQUES LOCAUX

Article 3 :

« Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on post-operative pain »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier, H. Le Guen, D. Holopherne, R. Cavagna, J.-M. Bouler

Journal of Biomedical Materials Research Part B, 2009 (*En révision*)

Brevet N°08290010.1-1219 (en annexe)

« Analgesic apatitic calcium-phosphate cement »

H. Le Guen, Cavagna. R, I. Khairoun, **E. Verron**, P. Janvier, O. Gauthier, JM. Bouler

I Problématique

La douleur osseuse postopératoire est intense durant les premiers jours qui suivent l'intervention chirurgicale et compromet, en l'absence de traitement adapté, la réhabilitation fonctionnelle précoce du patient. La stratégie thérapeutique s'appuie sur une approche multimodale où l'analgésie locorégionale a toute sa place. En effet, par son efficacité analgésique largement documentée, cette approche locale permet de réduire la consommation de morphiniques améliorant ainsi la tolérance du patient à ce traitement, de débiter précocement une kinésithérapie intensive et de réduire la durée d'hospitalisation et donc le coût. Considérant l'importance de l'analgésie locorégionale, nous avons développé un substitut osseux phosphocalcique associé à une molécule à visée analgésique, la bupivacaïne. Ce dispositif combiné est envisagé dans la prise en charge de la douleur postopératoire après un acte de chirurgie orthopédique nécessitant un comblement osseux et vise, plus précisément, la reconstruction osseuse après prise de greffon d'os iliaque, acte ressenti comme étant très douloureux. Le substitut osseux devrait permettre la reconstruction du défaut osseux et reconstituer ainsi le capital osseux du patient en vue d'éventuelles greffes ultérieures. Cette reconstruction osseuse préviendra certainement le risque de fractures de crête iliaque fragilisée lors du prélèvement²⁶⁵. De plus, la libération directement *in situ* de la bupivacaïne devrait participer activement à la prise en charge globale de la douleur.

Nos travaux préliminaires ont été menés en vue d'évaluer l'effet analgésique apporté par un vecteur phosphocalcique, la CDA (Calcium Deficiente Apatite), chargé en bupivacaïne (article 4).

Deux interrogations majeures ont été soulevées durant cette étude :

-Comment associer la bupivacaïne à la matrice phosphocalcique ?

-La libération de la bupivacaïne à partir de la CDA s'accompagne t'elle d'un effet analgésique chez l'animal ?

II Dispositif combiné « CDA- Bupivacaine » dans la prise en charge de la douleur osseuse postopératoire (article3)

Résumé de l'article :

La CDA est connue comme étant le précurseur chimique des BCP. Les BCP, mélanges d'HA et de β -TCP, sont largement utilisés en tant que substituts osseux en chirurgie de reconstruction osseuse. Les objectifs de cette étude sont (1) d'étudier *in vitro* le profil de libération d'un anesthésique local préalablement chargé sur la CDA, (2) d'évaluer l'effet analgésique de notre système combiné. Pour cela, la CDA a été chargée avec de la bupivacaine à 1% , 4% et 16% par compaction isostatique. Les profils de libération indiquent que la bupivacaine est totalement libérée en 24 heures. Nous avons implanté la CDA chargée avec de la bupivacaine (0%, 1%, 4% et 16%) dans le fémur distal de rats Wistar. L'analgésie a été déterminée en utilisant le test du monofilament de Von Frey et en mesurant la réponse inflammatoire et le score neurologique. Pendant les premiers jours postopératoires, la CDA chargée en bupivacaine apporte un effet analgésique dose dépendant. Ces résultats suggèrent que notre système combiné pourrait limiter voire prévenir la douleur liée à un acte de chirurgie de reconstruction osseuse.

Article 3 :

« Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine
on post-operative pain »

E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier, H. Le Guen, D. Holopherne, R. Cavagna, JM. Bouler

Journal of Biomedical Materials Research part B, 2009 (Révision)

III Discussion

L'objectif de cette étude est de développer un nouveau système phosphocalcique combiné dans la prise en charge de la douleur postopératoire, qui compromet fortement la rééducation précoce et rapide du patient. Les données de la littérature ont conforté notre idée de rechercher à prolonger l'efficacité des anesthésiques locaux pour la prise en charge de la douleur aiguë et ainsi pour la prévention de sa chronicisation. Notre approche locale repose sur l'association d'un phosphate de calcium (PCa), la CDA (Calcium Deficiente Apatite), avec une molécule à visée analgésique, la bupivacaïne. La CDA, phase phosphocalcique précurseur de céramiques utilisées en tant que substituts osseux, possède de bonnes propriétés d'ostéoconduction et de biorésorbabilité. De par sa structure nanocristalline, la CDA se rapproche de l'apatite biologique et ses nanocristaux lui confèrent une surface spécifique importante et des propriétés de compaction, mises à profit pour associer la bupivacaïne. Enfin, la CDA entre dans la composition des ciments apatitiques ce qui laisse entrevoir des possibilités d'optimiser notre vecteur si notre concept s'avère judicieux. C'est pourquoi la CDA nous semble être un bon vecteur phosphocalcique pour justifier, dans un premier temps, l'intérêt de notre approche analgésique locale. Nous avons choisi d'associer la CDA avec la bupivacaïne qui fait partie des anesthésiques locaux largement utilisés en clinique. Elle présente un pouvoir anesthésique élevé, quatre fois supérieur à celui de la lidocaïne, et une durée d'action prolongée. Sa cardiotoxicité constitue sa principale limite d'utilisation, cependant, nous espérons en libérant *in situ* la bupivacaïne limiter son passage systémique. Le protocole d'association consiste à imprégner les grains de CDA dans une solution alcoolique de bupivacaïne. La compaction isostatique du mélange obtenu renforce l'adhésion des grains entre eux. L'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et spectrométrie de masse indiquent que cette méthode d'association ne dégrade pas la bupivacaïne.

Nous avons ensuite étudié le profil de libération de la bupivacaïne à partir de la CDA. Dans cette optique, il a fallu définir et valider une méthode de dosage de la bupivacaïne. Son dosage se fait par spectrophotométrie dans l'ultraviolet. Aux faibles longueurs d'onde (< 200 nm), le dosage est plus sensible, de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$, mais le résultat est faussé par la présence d'ions phosphates libérés par la CDA puisqu'ils absorbent aux mêmes longueurs d'onde. Aux plus fortes longueurs d'onde (262-270nm), les ions phosphates n'interfèrent plus

avec le dosage, néanmoins le dosage perd en sensibilité. La bupivacaïne a finalement été dosée à 262nm. Les résultats indiquent que la bupivacaïne est libérée rapidement, soit 80% en 5 heures. Au bout de 24 heures, la libération de la bupivacaïne à partir de la CDA est complète. Cette libération rapide révèle l'absence d'interactions fortes existant entre la bupivacaïne et la CDA. Ces essais *in vitro* ont permis de vérifier que notre système combiné peut libérer la bupivacaïne sans modification de sa structure. Même si la structure de la bupivacaïne est conservée, cela ne garantit pas le maintien de son activité biologique. Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant d'évaluer une activité analgésique. Seule l'expérimentation animale peut démontrer l'effet analgésique apporté par notre dispositif combiné et valider ainsi notre preuve de concept.

Pour cela, 50 rats Wistar mâles ont été implantés de façon unilatérale en site cortico-spongieux (défaut cylindrique de 3mm en fémur distal) avec 50mg de CDA, associée respectivement avec 0%, 1%, 4% et 16% de bupivacaïne. L'évaluation de la douleur repose sur trois critères définis chez le rat: l'hyperalgésie mécanique mesurée par le monofilament de Von Frey, la réponse inflammatoire et le score neurologique. Pour corriger un éventuel biais lié à la variabilité biologique et à la subjectivité de l'évaluation de la douleur, nous avons utilisé un grand échantillon de rats (50). Les résultats obtenus à partir de ces trois tests mettent en évidence un effet analgésique significatif apporté par notre système combiné en comparaison avec la CDA seule. Le test du Von Frey semble être le test le plus sensible des trois puisqu'il permet d'évaluer la douleur pendant les 72 premières heures postopératoires, avant que le rat ne récupère totalement ses capacités. Les autres tests confirment l'effet analgésique de notre dispositif combiné pendant les 48 premières heures postopératoires. Au-delà, le groupe implanté avec de la CDA seule retrouve ses aptitudes initiales.

L'ensemble des résultats *in vivo* démontrent l'efficacité analgésique à court terme de notre approche locale. Cependant, le modèle rat présente des limites liées à sa résistance et sa grande capacité de récupération. Il n'est pas adapté pour évaluer la douleur au-delà du 2^{ème} jour postopératoire. Avec le test de Von Frey, même si l'effet reste significatif au 3^{ème} jour postopératoire, il est tout de même à la limite de la significativité. Compte tenu des limites du modèle rat, d'autres animaux, tels que le lapin et le chien, ont été envisagés pour évaluer la douleur à plus long terme.

Malgré les limites de cette première étude, les résultats obtenus à partir de la CDA sont encourageants pour la suite des travaux. Cette étude préliminaire met clairement en évidence l'effet analgésique apporté par la libération *in situ* de la bupivacaïne à partir de la CDA. Dans la littérature, c'est la première étude qui démontre l'intérêt d'un tel dispositif phosphocalcique combiné dans la prise en charge de la douleur osseuse postopératoire. Nous avons décidé de poursuivre et d'optimiser notre projet par la recherche d'un nouveau vecteur phosphocalcique plus adapté. En effet, la texture pulvérulente de la CDA ne permet pas d'obtenir une libération prolongée de la bupivacaïne sur plusieurs jours et, d'un point de vue pratique, la poudre de CDA n'est pas la forme la plus adaptée en clinique. C'est pourquoi conscients des limites de la CDA, nous avons mis au point un ciment phosphocalcique injectable, idéal pour une approche chirurgicale mini invasive. Il s'agit d'un ciment phosphocalcique durcissable *in situ*, biocompatible et biorésorbable. Plusieurs méthodes d'incorporation de la bupivacaïne au sein du ciment ont été testées. Les premiers essais tendent à montrer que la texture du ciment permet de prolonger la libération de la bupivacaïne sur plusieurs jours, profil en adéquation avec les attentes cliniques. Actuellement, nous vérifions que la présence de la bupivacaïne ne modifie pas les propriétés intrinsèques du ciment en terme de résistance mécanique, de temps de prise, de dureté, de temps de travaillabilité et d'injectabilité. D'après les premiers résultats, il semblerait que la bupivacaïne n'affecte pas la résistance mécanique à la compression. En revanche, elle ralentit le temps de prise. Cet effet peut être corrigé en modifiant le ratio liquide : solide du ciment.

D'autre part, nous avons voulu évaluer l'effet analgésique de notre nouveau ciment combiné après implantation chez le lapin au niveau du fémur proximal. Il s'est avéré que le lapin n'est pas un bon modèle de la douleur car, au cours de l'expérimentation, il ne manifeste aucune réaction et reste prostré. Néanmoins, étant un modèle reconnu de la repousse osseuse, nous étudions actuellement chez le lapin l'impact de la bupivacaïne sur ce phénomène biologique. Compte tenu des propriétés anti-inflammatoires de la bupivacaïne et du rôle de l'inflammation dans les processus de résorption/substitution osseuse, nous pouvons suspecter un retentissement de la libération de la bupivacaïne sur la repousse osseuse. D'autre part, nous avons réalisé des prélèvements sanguins régulièrement pendant les 72 premières heures qui ont révélé l'absence de passage systémique de la bupivacaïne. Ces résultats suggèrent que le risque de toxicité générale de la bupivacaïne semble être écarté.

La principale perspective découlant de ces études est d'évaluer l'effet analgésique de notre ciment phosphocalcique combiné dans un modèle *in vivo* plus adapté. Nous prévoyons d'utiliser le chien comme prochain modèle animal. Il devrait permettre d'évaluer la douleur à plus long terme et de réaliser un prélèvement de crête iliaque en vue de se rapprocher des indications qui pourraient être proposées prochainement en clinique humaine.

➤ Conclusion :

Nos études précédentes, portant sur l'association CDA-bisphosphonate, ont démontré l'intérêt d'utiliser la CDA comme vecteur de principes actifs. Sur la base de ces données, nous avons développé un nouveau système à libération de bupivacaïne à partir de la CDA pour la prise en charge de la douleur postopératoire liée au prélèvement de crête iliaque. Après avoir validé l'efficacité de cette association, nous poursuivons actuellement notre projet en développant un ciment PCa combiné.

Partie C
ETUDE DES EFFETS CELLULAIRES
DU GALLIUM

Article 4

« Gallium modulates osteoclastic bone resorption *in vitro* without affecting osteoblasts »

E. Verron, M. Masson, S. Khoshniat, L. Duplomb, Y. Wittrant, M. Baud'huin, Z. Badran,
B. Bujoli, P. Janvier, JM. Bouler, J. Guicheux

Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009 (Soumis)

I Introduction

Dans le cadre de la prévention des fractures ostéoporotiques, nous avons mis au point des systèmes de libération de principes actifs basés sur l'association entre des substituts osseux phosphocalciques et des inhibiteurs de la résorption osseuse (IRO). La structure chimique des PCa (apatite, TCP...) rend possible leur substitution ionique par des groupements d'atomes ou des ions. Cette propriété a été exploitée pour associer des bisphosphonates, via leurs groupements phosphonate, aux PCa. Dans cette logique d'association chimique, nous avons recherché de nouvelles molécules pouvant être associées avec des PCa et possédant un potentiel antirésorption afin de développer d'autres générations de substituts osseux combinés. Les données de la littérature suggèrent que l'élément gallium (Ga) pourrait avoir un effet pharmacologique sur les cellules osseuses. En effet, le gallium est utilisé en clinique humaine dans le traitement des hypercalcémies d'origine maligne, dans le myélome multiple et dans la maladie osseuse de Paget. Ces indications cliniques laissent présager un effet inhibiteur du Ga sur la résorption osseuse. Seules quelques études très anciennes suggèrent en effet que le Ga présenterait un effet inhibiteur sur l'activité de résorption ostéoclastique sans étudier le mécanisme d'action^{266,267}.

Par ailleurs, l'ion Ga est potentiellement incorporable dans la structure cristalline des PCa. Considérant l'éventuelle capacité du Ga à diminuer la résorption ostéoclastique et ayant démontré l'intérêt d'une approche locale dans le traitement des déséquilibres du remodelage osseux, nous avons envisagé d'associer le Ga aux PCa.

Les travaux préliminaires^{268,269} (Brevets US61-157.043 et US61-157.039) ont décrit deux modes possibles d'incorporation du Ga dans les structures cristallines phosphocalciques (TCP, apatite). Le Ga peut être associé sous forme d'ion Ga^{3+} dans la structure phosphocalcique. L'intégration du Ga peut également se faire, sous forme d'ions gallate, à la surface du PCa. L'ensemble des données chimiques et cliniques indique que le Ga pourrait être un candidat potentiel dans le développement d'un nouveau système à libération prolongée d'IRO.

L'étude bibliographique sur les effets biologiques du Ga a fait l'objet de la première partie de ce travail. Cette étude a mis en évidence l'absence de données concordantes concernant les effets du Ga sur les cellules osseuses. Il nous est donc apparu nécessaire de clarifier l'effet

biologique du Ga. Cette évaluation *in vitro* a été décrite au cours de la deuxième partie de ce travail (article 4).

II Données de la littérature

II.1 L'élément Gallium

Le gallium, de symbole chimique Ga, est un élément du groupe IIIa de la classification périodique de Mendeleïev. Le gallium est un ion trivalent en solution, Ga^{3+} qui possède un rayon ionique de 0,62 angström (Å) et une masse atomique relative de $69,723 \text{ g.mol}^{-1}$ ²⁷⁰.

Pour mener à bien nos études *in vitro*, nous avons voulu connaître le comportement du Ga en solution et, plus exactement, sous quelle forme se trouve le Ga selon le pH de la solution. Pour cela, le diagramme établi par Benezeth et al. indique qu'à pH acide, le Ga se trouve sous forme ionique Ga^{3+} (figure 17) ²⁷¹. De cette manière, le Ga pourrait entrer en compétition avec le Ca^{2+} dans les lacunes de Howship. Par opposition, à pH physiologique, le Ga se trouve sous forme gallate $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$.

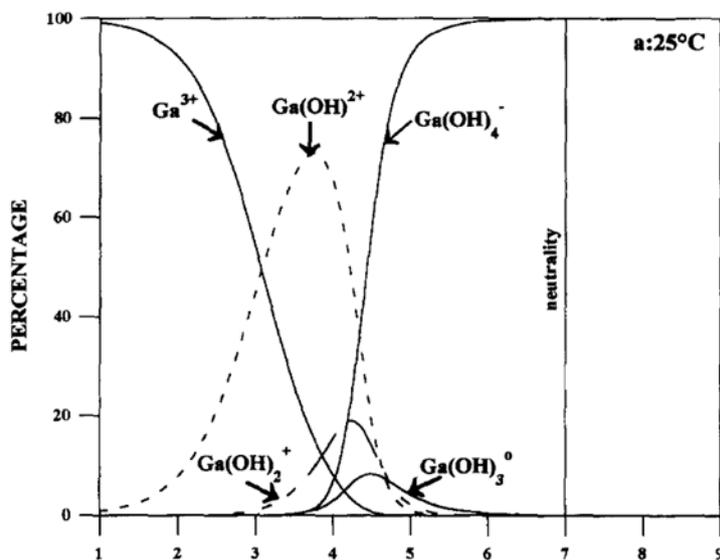


Figure 17: Répartition des espèces de Ga formées en solution selon le pH, d'après Benezeth et al ²⁷¹.

L'ion Ga^{3+} , étant un acide fort, il se lie facilement et fortement à des bases fortes, comme les ions OH^- . L'ion Ga^{3+} se coordine à 6 molécules d'eau. Les molécules d'eau sont progressivement remplacées par des groupements hydroxyle. A pH acide (pH =3-4), le gallium hexahydraté précipite sous forme d'un hydroxyde de gallium amorphe. Puis ce composé amorphe se transforme au cours du temps en une espèce cristalline de type

GaO(OH) plus stable. Cette espèce, soluble en solution basique, déplace l'équilibre vers la formation d'un anion gallate $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$.

II.2 Applications cliniques

Le Ga a été découvert par le chimiste français Paul Emile Lecoq de Boisbaudran en 1875. C'est seulement à partir de 1931 qu'est apparu l'intérêt thérapeutique du Ga lorsque Levaditi utilisa le tartrate de Ga pour éradiquer la syphilis dans un modèle expérimental chez le lapin ou encore le *Trypanosoma evansi* chez la souris. Malgré ces premières observations encourageantes, ce n'est qu'à la fin des années 40 que la communauté scientifique s'est intéressée à la toxicité et à la distribution tissulaire du Ga. Le Ga, plus précisément ses radioisotopes 67 et 72, présente une affinité pour tout tissu en croissance ou en remodelage (os et tumeur)²⁷². La poursuite des travaux dans les années 70 a permis de démontrer que le Ga s'accumulait aussi dans des sites inflammatoires et infectieux (granulome inflammatoire, synovite). Par ailleurs, le Ga a été retrouvé au niveau rénal, hépatique et splénique²⁷³.

Les recherches se sont rapidement orientées vers le potentiel anticancéreux du Ga, observé aussi avec les autres éléments chimiques appartenant au même groupe IIIa de la classification périodique de Mendeleïev (ex : le platine, Pt). Les premières études cliniques réalisées chez des patients atteints de cancers à des stades avancés (lymphome résistant, cancer pulmonaire à petite cellule, sarcome) ont mis en évidence que 2/3 de ces patients ont développé une hypocalcémie modérée. Cette observation a permis d'évaluer le Ga dans le traitement d'hypercalcémie d'origine maligne. Les études cliniques de phase I et II rapportent qu'il est préférable d'utiliser le Ga en perfusion continue à raison de 100-300mg/kg/jr pendant 5 à 7 jours toutes les 3-4 semaines afin de limiter la néphrotoxicité qui devient alors très marquée lors d'administration de bolus de 750mg/m² toutes les 3 semaines²⁷⁴. Ce protocole d'administration (100-300mg/kg/jr) permet d'obtenir une concentration plasmatique de 1mg/L qui s'est révélée être, au vu des essais cliniques, très efficace dans l'hypercalcémie d'origine maligne²⁷⁵⁻²⁷⁷. Face à ces résultats très concluants, la société Genta a commercialisé en 2003 le nitrate de gallium, sous la dénomination Ganite®, comme traitement alternatif de l'hypercalcémie d'origine maligne²⁷⁸. Bien que les BP soient les molécules de référence dans le traitement de ces hypercalcémies, le Ga reste cependant plus efficace. Des dérivés sont actuellement en phase d'études cliniques tel que le maltolate de gallium administrable *per os* (complexe de 3-hydroxy-4-pyrones).

Par ailleurs, l'administration de Ga permet de diminuer l'hyperactivité de résorption osseuse rencontrée lors de myélome multiple, de métastases osseuses et de maladie osseuse de Paget. En chimiothérapie, le Ga réduit la perte osseuse chez les patients atteints de myélome, diminue leur douleur, le nombre de fractures vertébrales et allonge la survie de ces patients de 7 ans par rapport à une chimiothérapie classique²⁷⁸⁻²⁸¹.

D'autres résultats prometteurs ont été observés dans le traitement du carcinome de la vessie, du carcinome urothélial et des lymphomes. En association avec la vinblastine et l'ifosfamide dans le traitement des métastases du carcinome urothélial, le Ga (300mg/m²/24h pendant 5jours toutes les 3 semaines) a permis d'obtenir 67% de réponses positives dont 41% de rémission totale²⁸². Cependant, ces résultats bénéfiques sont à nuancer compte tenu du développement d'une néphrotoxicité et d'une hématotoxicité sévère associant une granulocytopenie, une anémie sévère et une thrombocytopenie²⁸³. En revanche, l'efficacité clinique du Ga reste très controversée dans le traitement du mélanome, des cancers ovariens, de la prostate, du rein^{284,285} et du sein²⁸⁶.

II.3 Mécanisme d'action

L'ion Ga³⁺ présente une similarité chimique avec de nombreux ions (Fe³⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺...), souvent co-facteurs d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN et des protéines^{270,286}. En revanche, l'ion Ga³⁺ n'est pas réduit en ion Ga²⁺ et n'interfère pas *in vivo* avec l'ion ferreux, Fe²⁺, présent notamment dans l'hémoglobine et la myoglobine. Le Ga présente une affinité pour l'ADN 100 fois supérieure à celle du Mg²⁸⁷. Dès lors, le Ga entre en compétition avec le Mg et se fixe sur l'ADN modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle. Le Ga induit la condensation de la chromatine, étape précoce impliquée dans le processus d'apoptose^{288,289}. D'autre part, le Ga, plus exactement le complexe transferrine-Ga, se fixe sur la ribonucléotide réductase, enzyme fer-dépendante, impliquée dans la synthèse de l'ADN. Le Ga inhibe également l'activité de nombreuses autres enzymes telles que les ATPases, les DNA polymérases²⁸⁶... Le Ga bloque aussi la polymérisation de la tubuline²⁸⁶. L'ensemble de ces effets explique en partie l'effet antitumoral du Ga.

Le mécanisme d'internalisation du Ga dans les cellules n'est pas totalement élucidé. Il est lié à la similarité chimique qui existe entre l'ion Ga³⁺ et l'ion ferrique, Fe³⁺. La transferrine (TF) est la principale protéine de transport du fer. Elle comporte deux sites de fixations pour l'ion Fe³⁺. L'affinité de la TF pour son récepteur (TFR) augmente si ses deux sites sont occupés par

le fer (transferrine diférique). Le complexe TF-Fe se fixe au TFR, l'ensemble est ensuite internalisé par endocytose. La vésicule formée par invagination de la membrane fusionne avec un endosome entraînant une acidification de la vésicule (pH=5,5). Cette modification du pH favorise la dissociation du complexe. Le fer est ainsi libéré dans le cytoplasme et le complexe TF-TFR est recyclé. Dans la vésicule d'endosome, la TF conserve son affinité pour le RTF. Lors de l'exocytose, le complexe TF-RTF se trouve subitement confronté à un pH plasmatique de 7,4 provoquant la dissociation complète du complexe. Il existe deux types de TFR, TFR1 et TFR2. Le TFR1 est exprimé par les cellules cancéreuses tandis que le TFR2 est exprimé par les cellules normales, essentiellement les hépatocytes et les précurseurs érythrocytaires. Le TFR2 comporte deux isoformes, la forme membranaire (TFR2 α) et la forme soluble (TFR2 β). Quelle que soit l'isoforme, le fer présente une affinité 30 fois plus élevée pour le TFR1.

Le Ga, sous forme Ga³⁺, peut se fixer à la TF. Néanmoins, l'affinité du fer pour la TF reste largement supérieure, elle est 400 fois plus élevée par rapport au Ga. Le système TF-TFR intervient dans la distribution du Ga dans la plupart des tissus²⁹⁰. Des études *in vitro* ont mis en évidence une corrélation entre la concentration de TF et la capture du Ga par les cellules²⁹¹. La captation intracellulaire du Ga diminue dès saturation de la TF avec du fer. Néanmoins, il existe un mécanisme indépendant de la TF qui serait impliqué dans la distribution du Ga dans le tissu osseux et dans certaines tumeurs comme le myélome²⁹⁰⁻²⁹². Dans ces cas précis, la pénétration intracellulaire du Ga n'est pas modifiée en absence de TF (souris transgénique de Bershtein) et lorsque la TF est saturée par du fer²⁹¹. De même, l'ajout d'anticorps anti-TF dans le milieu ne diminue pas la teneur en Ga dans ces tissus²⁹². Ces données plaident en faveur d'un mécanisme indépendant de la TF. Concernant l'ostéoclaste, il semblerait qu'après endocytose de la TF au niveau du pôle basolatéral de l'ostéoclaste, la TF serait libérée dans la lacune de résorption²⁴. Le complexe TF-Fer étant instable en milieu acide, le complexe TF-Ga pourrait alors se former préférentiellement dans les lacunes de Howship. Cette hypothèse n'a actuellement pas été vérifiée. D'autre part, bien que les TFR2 se trouvent sur la plupart des cellules nucléées, la présence de TFR2 sur les ostéoclastes n'a pour le moment pas été décrite.

II.4 Le gallium et les cellules osseuses

II.4.1 Distribution osseuse du gallium

Le gallium présente une affinité pour différents sites : tumoraux, infectieux, inflammatoires et osseux. Concernant le tissu osseux, le gallium se fixe préférentiellement dans les régions de l'os métaboliquement actives (métaphyse, cartilage de croissance, zone fracturaire...). Cette spécificité de la distribution osseuse du gallium a été confirmée lors de l'étude menée par Bockman et al.²⁹³. Cependant, les auteurs ne fournissent aucune explication quant au mécanisme de fixation osseuse du gallium. Bockman et al émettent l'hypothèse selon laquelle le gallium se fixerait sur la matrice minérale par substitution du Ca, modifiant ainsi la solubilité de cette phase. Cette hypothèse rejoint l'étude de Korbas et al. qui décrit l'effet *in vitro* du gallium sur la formation d'hydroxyapatite²⁶⁹. Cette étude rapporte deux mécanismes d'interaction du gallium avec l'os selon le degré de maturation de la phase minérale de l'os. Lorsque le gallium est ajouté précocement c'est-à-dire durant la phase initiale de minéralisation, les auteurs ont observé une substitution du calcium par le gallium. Les modifications configurationnelles résultantes provoquent le blocage de la croissance cristalline. Considérant le diagramme de Benezeth et al., il est difficile d'imaginer comment le Ga, à pH physiologique, et donc sous forme de gallate, est inclus dans la phase minérale ? En revanche, si le gallium est ajouté à un stade avancé de la minéralisation, il ne peut pas être incorporé directement dans la structure de l'hydroxyapatite. Il serait alors adsorbé à sa surface freinant ainsi la croissance et la solubilité des cristaux d'HAP.

II.4.2 Activités *in vitro* du gallium

II.4.2.1 Activité de résorption ostéoclastique

Quelques études mettent en évidence l'effet inhibiteur du Ga sur l'activité de résorption ostéoclastique^{266,294-296}. Des expériences chez l'animal démontrent que les fragments d'os traités avec du Ga apparaissent plus résistants à la résorption²⁶⁷. Cet effet ne s'accompagne pas d'une toxicité vis-à-vis des ostéoclastes, même au-delà de 300µM de Ga. Hall et al démontrent que le Ga inhibe de façon dose-dépendante l'activité de résorption. A la dose de 100µg/mL, le Ga inhibe 64% de l'activité de résorption²⁶⁶. Cette forte dose n'induit ni changement morphologique des ostéoclastes ni réduction de leur nombre. L'inhibition est également observée à partir de pastilles traitées préalablement avec du gallium, mais dans de plus faibles proportions ; 34% d'inhibition est observée avec 100µg/mL de Ga. Ce résultat

reflète la capacité du gallium à s'adsorber à la surface osseuse et rester actif. Cependant, il existe une contradiction entre ces doses biologiquement actives et les doses utilisées en clinique (maladie de Paget, hypercalcémie d'origine maligne). Dans ces pathologies, la concentration sérique en gallium efficace est estimée entre 1,9 et 3µg/mL soit environ 2% des doses testées *in vitro*. D'autre part, contrairement à Chambers et al, l'étude de Blair et al montre que le gallium au-delà de 50µM est toxique vis-à-vis des ostéoclastes²⁹⁷. Blair et al ont voulu comprendre d'où provenaient ces contradictions. Pour cela, ils ont caractérisé la répartition du Ga entre l'os, les cellules et le milieu²⁹⁷. Le gallium présente une forte affinité pour l'os mais la cinétique de fixation à l'os est lente, estimée aux alentours de 48H. Plusieurs facteurs conditionnent la fixation osseuse du Ga. Par exemple, la présence d'ostéoclastes avant l'ajout du Ga réduit de 40% sa fixation osseuse. De même, la présence de sérum diminue de 30% la fixation osseuse du gallium par compétition de fixation. Ainsi compte tenu des variations de la quantité de Ga réellement fixée à l'os selon les conditions de culture, Blair et al ont décidé de raisonner directement en terme de quantité de gallium fixé sur l'os. Au bout de 48H de culture, 10pmoles de Ga/µg d'os diminue de moitié la résorption ostéoclastique. Au-delà de 50pmoles/µg d'os, la résorption est totalement inhibée.

Ces études suggèrent fortement que l'effet hypocalcémiant du Ga observé en clinique résulterait de son activité anti résorption. Cependant les doses efficaces du Ga ainsi que les durées de traitement diffèrent selon les études. De même, la toxicité directe du Ga vis-à-vis des ostéoclastes est très controversée. Ces études ont seulement mis en évidence que le Ga inhibe l'activité de résorption ostéoclastique sans pour autant en décrire le mécanisme d'action.

II.4.2.2 Activité ostéoblastique

Peu d'équipes se sont intéressées aux effets du gallium sur l'activité ostéoblastique. L'équipe de Jenis a mis en évidence, sur deux modèles cellulaires (lignée d'ostéosarcome ROS, ostéoblastes primaires),²⁹⁸ que le Ga (50µM) double l'expression du collagène de type I (Coll-I) et diminue celle de l'ostéocalcine. Ces auteurs n'ont pas confirmé que cette modification de l'expression des ARN se répercute sur la production et l'activité des protéines correspondantes. D'autres études *in vitro* rapportent des effets similaires sur l'expression des ARN de ces marqueurs^{299,300}. Aucune équipe n'a étudié l'effet du Ga sur la viabilité, la prolifération et l'activité des ostéoblastes.

II.4.3 Activité *in vivo* du gallium

L'étude de Wakley et al rapportent que le Ga administré à faible dose (0,9mg/kg) chez des rats sains pendant 21 jours inhibe de 32% la formation osseuse³⁰¹. Aux plus fortes doses, s'ajoutent à ces effets, une inhibition de la résorption osseuse, un effet hypocalcémiant et une altération du métabolisme de la vitamine D. Ces données sont contredites par l'étude de Jenis et al qui n'observent aucune modification de l'expression de marqueurs ostéoblastiques (Coll-I) et de la DMO après 3 semaines de traitement chez des rates saines²⁹⁸. Cette absence d'effet *in vivo* du Ga a également été démontrée par Stern et al, qui se sont intéressés plus particulièrement aux effets du Ga sur la perte osseuse liée à une carence oestrogénique³⁰². D'autre part, cette étude révèle l'apparition à long terme d'une hématotoxicité et d'une néphrotoxicité. Ces derniers résultats sont cependant à nuancer. Dans l'étude de Stern et al, le Ga est administré par voie sous cutanée. La libération intra osseuse du Ga à partir de nos dispositifs combinés devrait optimiser l'effet anti résorption du Ga. Par ailleurs, la libération *in situ* du Ga ainsi que l'affinité osseuse du Ga devraient limiter le risque de passage systémique du Ga et donc le développement d'effets secondaires.

III Etude *in vitro* du gallium sur les cellules osseuses

III.1 Problématique

L'ostéoporose post ménopausique se manifeste cliniquement par le développement de fractures osseuses. Ces fractures sont redoutées de par la morbidité et la mortalité qu'elles entraînent. La prévention de ces fractures constitue donc un enjeu majeur de santé publique. Ces fractures sont essentiellement localisées au niveau du fémur proximal, du rachis et du poignet. Cette localisation préférentielle pour certains sites osseux justifie l'intérêt d'une approche locale de la prévention des fractures ostéoporotiques.

L'injection de substituts osseux phosphocalciques vecteurs d'inhibiteurs de la résorption osseuse est aujourd'hui considérée comme une approche prometteuse pour la prévention des fractures ostéoporotiques³⁰³. La deuxième partie de notre travail indique qu'il est possible de développer des systèmes à libération prolongée de bisphosphonates en les associant à des biomatériaux phosphocalciques. Dans le but de développer des systèmes combinés associant des PCa avec de nouvelles molécules anti-résorption, nous nous sommes intéressés au gallium.

Quelques études *in vitro* tendent en effet à montrer que le Ga inhibe l'activité de résorption des ostéoclastes sans en expliquer le mécanisme d'action^{266,294}. Cependant, les doses efficaces du Ga diffèrent selon les études. Dans ce contexte, les objectifs de notre étude sont de (1) confirmer l'effet inhibiteur de la résorption ostéoclastique par le Ga; (2) documenter l'effet du Ga sur l'« ostéoclastogénèse », la viabilité et l'apoptose des ostéoclastes.

Par ailleurs, afin de justifier l'intérêt de notre approche locale, le Ga doit inhiber l'activité de résorption ostéoclastique sans pour autant affecter la viabilité et l'activité des ostéoblastes. Les faibles données de la littérature ne nous permettent pas de conclure à un effet du Ga sur les ostéoblastes. Au cours de notre étude, nous nous sommes donc également intéressés aux effets *in vitro* du Ga sur les ostéoblastes.

III.2 Résumé de l'article

Les fractures osseuses touchent préférentiellement le fémur proximal, le rachis et le poignet. Cette spécificité des sites ostéoporotiques justifie l'intérêt d'une approche locale de la prévention des fractures ostéoporotiques. Une des stratégies est de renforcer localement ces sites osseux en libérant *in situ* des inhibiteurs de la résorption osseuse à partir de biomatériaux phosphocalciques. Parmi les inhibiteurs de la résorption osseuse, nous nous sommes intéressés au gallium (Ga). L'activité cellulaire du Ga étant faiblement documentée dans la littérature, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet *in vitro* du Ga sur les cellules osseuses. Nous avons démontré que le Ga inhibe de façon dose-dépendante l'activité de résorption des ostéoclastes isolés à partir d'os longs de lapereaux. Par ailleurs, nos données mettent en évidence que le Ga diminue fortement l'expression de marqueurs ostéoclastiques (TRAP, CTR, CTK, RANK et OC-STAMP) dans les RAW 264.7. De plus, le Ga inhibe de façon dose-dépendante la formation de cellules multinuclées TRAP+ dans trois modèles ostéoclastiques. Enfin, nos données indiquent que le Ga n'affecte ni la viabilité ni l'activité des ostéoblastes (lignée murine MC3T3-E1 et ostéoblastes primaires dérivés de calvaria de souris). Notre étude démontre que le Ga réduit de façon dose-dépendante l'activité de résorption ostéoclastique, la différenciation et la formation des ostéoclastes sans affecter les ostéoblastes. Ainsi, le Ga pourrait être un candidat intéressant dans le développement d'un nouveau système à libération prolongée d'un inhibiteur de la résorption osseuse par des biomatériaux phosphocalciques.

Article 4

« Gallium modulates osteoclastic bone resorption *in vitro* without affecting osteoblasts »

E. Verron, M. Masson, S. Khoshniat, L. Duplomb, Y. Wittrant, M. Baud'huin, Z. Badran,

B. Bujoli, P. Janvier, JM. Bouler, J. Guicheux

Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009 (Soumis)

III.3 Discussion

Dans le but de développer un nouveau système à libération prolongée de molécules antirésorption par des biomatériaux phosphocalciques, nous nous sommes intéressés au gallium (Ga). Compte tenu de l'absence de données convergentes dans la littérature, nous avons du, au préalable, documenter l'effet biologique du Ga sur les cellules osseuses.

Notre objectif final est de développer un nouveau système combiné de libération de Ga en site osseux. Pour justifier l'intérêt de notre concept, la première étape a été d'étudier l'effet du Ga sur l'activité ostéoclastique. Pour cela, nous avons à notre disposition un modèle *in vitro* de résorption ostéoclastique développé au sein du laboratoire (Rabbit Bone Cells, RBC)¹⁸⁶. L'activité d'ostéoclastes, isolés à partir d'os longs de lapereaux, est mise en évidence par la formation caractéristique de nombreuses lacunes de résorption. Cette activité est quantifiée selon la surface totale résorbée et le nombre total de lacunes par pastilles de dentine. Nos premiers résultats indiquent que l'activité de résorption des ostéoclastes issus d'os long de lapins est inhibée de façon dose dépendante par le Ga (1-100 μ M). Nos résultats confirment ainsi les quelques données de la littérature^{266,297}. Ainsi, l'ensemble de ces données corrobore l'effet inhibiteur du Ga sur la résorption ostéoclastique.

Afin de comprendre comment le Ga bloque l'activité de résorption ostéoclastique, nous avons décidé d'étudier l'effet du Ga sur la différenciation des ostéoclastes. Notre précédent modèle ostéoclastique, RBC, n'est pas un modèle pur. Il comporte une population cellulaire très hétérogène comprenant moins d'1% d'ostéoclastes. Il n'apparaît donc pas pertinent d'étudier, à partir de cette faible population ostéoclastique, la différenciation ostéoclastique. Pour cela, nous avons donc utilisé un modèle de différenciation ostéoclastique, la lignée monocyttaire RAW 264.7³⁰⁴. Après 6 jours de traitement par le RANK-L, les RAW 264.7 se différencient en ostéoclastes. L'obtention d'ostéoclastes a été mise en évidence par l'expression des principaux marqueurs ostéoclastiques (TRAP, CTR, CTK, RANK et OC-STAMP) et par la formation de cellules géantes multinuclées TRAP+. L'analyse par RT-PCR en temps réel indique que le Ga diminue fortement l'expression des marqueurs ostéoclastiques spécifiques. Cet effet n'a, pour l'instant, pas été décrit dans la littérature. Il serait intéressant par la suite de vérifier que cette modification de l'expression des transcrits se traduise par une diminution de l'expression des protéines correspondantes, notamment par des techniques classiquement utilisées telles que le western blot. Nous nous sommes cependant assurés que cette

modification transcriptionnelle est corrélée à une réduction de la formation des cellules TRAP⁺ multinuclées dans les deux modèles ostéoclastiques précédemment utilisés (RBC et RAW 264.7). La chute de l'expression des ARNm des principaux marqueurs ostéoclastiques s'accompagne en effet d'une nette réduction de la formation des cellules multinuclées TRAP⁺ et plus précisément, du nombre de noyaux par cellule. Le nombre moyen de noyaux par cellule, estimé entre 5 et 6 dans les conditions normales de culture, diminue de façon dose-dépendante en présence de Ga. Après traitement au Ga à 100µM, les cellules TRAP⁺ formées sont moins larges et contiennent en moyenne 3 à 4 noyaux chacune. Afin d'obtenir des données plus pertinentes, nous avons confirmé ces résultats dans un modèle ostéoclastique humain à partir de cellules CD14⁺ différenciées en ostéoclastes. Comme dans les précédents modèles ostéoclastiques (RBC et RAW 264.7), le Ga diminue de façon dose-dépendante la formation de cellules multinuclées TRAP⁺ dans ce modèle.

L'ensemble de ces données suggère fortement que le Ga inhiberait l'activité de résorption en bloquant la différenciation et la formation ostéoclastiques. L'inhibition devient très marquée en présence de 100µM de Ga. Elle semble indiquer que le Ga pourrait avoir un effet cytotoxique, spécifique ou non des ostéoclastes. Envisageant cette possibilité, nous avons évalué, qualitativement et quantitativement, la viabilité cellulaire aux travers de tests MTS et de colorations CTG dans les modèles RBC et RAW264.7. Aucune diminution de la viabilité cellulaire n'a été observée en présence de Ga. D'autre part, nous avons suivi la prolifération et la viabilité des RAW 264.7 par microscopie en temps réel pendant les 72 premières heures de différenciation (time lapse). Le Ga ne perturbe pas le comportement des cellules. Pour compléter cette étude sur la viabilité cellulaire, nous nous sommes demandés si le Ga pouvait induire l'apoptose. La coloration Hoechst réalisée sur les RAW 264.7, traitées pendant 6 jours avec du Ga, indique que le Ga n'induit pas la fragmentation de la chromatine, modification morphologique qui est caractéristique de l'apoptose. De nombreuses questions restent en suspens notamment concernant l'effet du Ga sur des ostéoclastes matures. Le modèle RBC y répond partiellement en ce sens qu'il comprend entre autre des ostéoclastes non encore matures. Les RAW 264.7, une fois différenciées en ostéoclastes, ont été incubées avec du Ga pendant différents temps (de 0 à 48 H). La coloration Hoechst montre que le Ga ne modifie pas la morphologie cellulaire.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le Ga affecte largement la différenciation, la formation et l'activité des ostéoclastes sans perturber la viabilité et l'apoptose des cellules.

Afin que notre approche locale soit optimale, le Ga doit inhiber l'activité de résorption ostéoclastique sans pour autant affecter la viabilité et l'activité des ostéoblastes. Les faibles données de la littérature ne nous permettent pas de conclure quant aux effets du Ga sur les ostéoblastes. C'est pourquoi, nous avons vérifié que le Ga, utilisé aux doses inhibitrices sur les ostéoclastes, n'affecte ni la viabilité, ni l'activité des ostéoblastes en utilisant 2 modèles cellulaires, la lignée MC3T3-E1 et des ostéoblastes primaires isolés à partir de calvaria de souris. Les tests MTS et le comptage cellulaire indiquent que le Ga ne réduit ni la viabilité, ni la prolifération ostéoblastique. De même, l'activité phosphatase alcaline n'est pas perturbée en présence de Ga. Par ailleurs, nous nous sommes demandés si le Ga présentait un effet sur la différenciation ostéogénique. Pour cela, nous avons testé le Ga sur des cellules souches mésenchymateuses isolées à partir de tissus adipeux humains. Nos résultats préliminaires tendent à montrer que le Ga n'affecte pas la différenciation ostéogénique. Ces données devront cependant être confirmées (données non publiées).

L'ensemble de ces résultats indique que le Ga inhibe l'activité de résorption des ostéoclastes sans affecter la viabilité et l'activité des ostéoblastes. Ces premiers résultats prometteurs doivent impérativement être confirmés *in vivo*, d'autant que les données *in vivo* de la littérature sont contradictoires. Jenis et al²⁹⁸ ne mettent pas en évidence un effet du Ga sur la DMO chez des rates saines bien qu'ils aient observé *in vitro* l'augmentation d'un marqueur osseux (Coll-I). La DMO n'est probablement pas le paramètre le plus sensible à mesurer à partir d'études de courte durée. Une analyse de la microarchitecture osseuse apporterait certainement des informations différentes sur l'effet *in vivo* du Ga. Enfin, la rate saine n'est pas nécessairement le modèle animal le plus adapté ; la rate ostéoporotique serait peut être plus sensible à l'effet du Ga. A ce titre, Stern et al n'observent aucun effet du Ga sur la repousse osseuse dans un modèle de rate ostéopénique³⁰². Dans cette étude, le Ga est administré par voie sous cutanée. Il est probable qu'avec une libération du Ga directement en site osseux par des systèmes combinés, nous puissions obtenir de meilleurs résultats.

Si les études chez l'animal ostéoporotique confortent l'effet inhibiteur du Ga sur l'activité de résorption, le Ga pourrait être un candidat intéressant dans le développement de nouveaux substituts osseux combinés.

Par ailleurs, une approche plus fondamentale pourra être envisagée afin d'éclaircir les mécanismes à l'origine des effets du Ga sur les ostéoclastes. Deux premières hypothèses peuvent être avancées.

-Le Ga pourrait interagir avec un récepteur à la surface des ostéoclastes. Sur la base de quelques arguments chimiques (cations, rayons ioniques), il est possible d'établir une similarité entre le Ga et le Ca. La variation de concentration extracellulaire en calcium régule l'activité de résorption et l'apoptose des ostéoclastes³⁰⁵. Cette régulation se fait par l'intermédiaire d'un récepteur sensible au Ca présent notamment sur les ostéoclastes³⁰⁶. Le Ga pourrait interagir avec ce récepteur et activer des voies de signalisation intracellulaires.

-Le mécanisme d'action peut être intracellulaire nécessitant au préalable une étape d'internalisation du Ga, TF dépendante ou non. Une fois dans le compartiment intracellulaire, le Ga, compte tenu de ses similarités avec de nombreux ions (Fe, Mg...), peut interagir avec des enzymes essentielles pour l'activité/fonctionnement et la survie des cellules.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du Ga sur deux types cellulaires du tissu osseux, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les études sur les cellules souches mésenchymateuses devront être approfondies avant de conclure à l'absence d'effet du Ga sur leur différenciation.

CONCLUSION

En chirurgie de reconstruction osseuse, le recours aux greffes osseuses est en constante progression liée aux traumatismes osseux, aux révisions de prothèses et aux arthrodèses vertébrales. Les limites des greffes et l'augmentation de la demande ont amené les chercheurs à développer des matériaux synthétiques à base de phosphates de calcium (PCa) qui doivent répondre à des critères de biocompatibilité, de bioactivité et de biofonctionnalité. Leurs indications cliniques concernent essentiellement la reconstruction en sites osseux sains ; certaines situations cliniques (ostéoporose, infection, inflammation, irradiation...) altérant les phénomènes de résorption/substitution de l'implant. C'est ainsi qu'a été développée une nouvelle génération de substituts osseux afin d'apporter une réponse osseuse dans ces contextes critiques. Pour cela, les substituts osseux ont été utilisés comme vecteurs actifs d'agents thérapeutiques. Dans ces systèmes combinés, le substitut osseux joue un double rôle : (1) conduire la néoformation osseuse et apporter des propriétés mécaniques primaires et (2) libérer *in situ* le principe actif et améliorer ainsi la biodisponibilité, l'efficacité et la tolérance vis-à-vis d'un traitement systémique.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à développer des systèmes combinés dans l'objectif de proposer une solution thérapeutique locale pour deux situations cliniques rencontrées en chirurgie orthopédique :

-la fragilité osseuse liée à l'ostéoporose ;

-la douleur osseuse postopératoire après un acte de prélèvement osseux.

Dans l'optique de consolider les sites fragilisés par l'ostéoporose et ainsi envisager de prévenir le développement de fractures, nous avons décidé d'associer des substituts osseux phosphocalciques avec des inhibiteurs de la résorption osseuse (IRO). Parmi les IRO, notre choix s'est porté vers les bisphosphonates (BP) qui sont efficaces et largement prescrits dans le traitement de l'ostéoporose. Nous avons choisi, dans un premier temps, de valider notre concept d'approche locale en utilisant la CDA (Calcium Deficiente Apatite) comme phase phosphocalcique vectrice des BP. Notre choix a été gouverné par les propriétés physico-chimiques de la CDA à savoir, sa structure chimique qui accepte de nombreuses substitutions ioniques partielles, sa surface spécifique qui est largement supérieure aux céramiques (hydroxyapatite, phosphate tricalcique et phosphates de calcium biphasés), sa stabilité en solution qui permet de caractériser et de modéliser les phénomènes d'échange et de libération du BP et enfin ses propriétés rhéologiques qui lui confèrent rapidement des propriétés

d'injectabilité sans étapes intermédiaires de broyage et de calibrage des grains. Par ailleurs, les ciments apatitiques injectables et autodurcissants sont composés de CDA ce qui ouvre des perspectives intéressantes d'optimisation de notre système combiné.

La justification de notre approche locale de prévention des fractures ostéoporotiques repose sur deux observations :

-la mauvaise observance et le développement d'effets secondaires du traitement systémique qui compromettent l'efficacité clinique des BP ;

-la localisation préférentielle des fractures ostéoporotiques (fémur proximal, rachis et poignet).

L'association chimique CDA-BP ayant été caractérisée avant ces travaux, nous avons vérifié *in vitro* que le BP conservait une activité biologique (article 1). En utilisant des modèles animaux appropriés (rates ostéoporotiques et brebis ostéoporotiques), nous avons mis en évidence que notre dispositif combiné améliore la microarchitecture et la fraction volumique osseuse dans un environnement ostéoporotique (article 2). Les effets bénéfiques observés chez l'animal nous ont conduits à envisager des études cliniques. Si les résultats encourageants observés lors de nos études précliniques se reproduisent chez l'Homme, ce dispositif combiné pourrait être proposé en clinique pour combler et renforcer les sites fragilisés par l'ostéoporose et prévenir ainsi le développement de fractures.

Dans cette même stratégie d'approche locale, nous avons décidé de mettre au point un nouveau dispositif phosphocalcique combiné pour la prise en charge de la douleur postopératoire en chirurgie de reconstruction osseuse. Plus précisément, nous visons, dans un premier temps, la douleur associée au prélèvement de crête iliaque qui est mal contrôlée et ce malgré l'administration de dérivés morphiniques. Pour soulager le patient, les anesthésistes ont souvent recouru aux infiltrations locales de molécules à visée analgésique. C'est en s'appuyant sur l'efficacité de cette technique que nous avons décidé de développer un système à libération de bupivacaïne qui fait partie des anesthésiques locaux largement utilisés. Ainsi, nous proposons (1) de reconstruire l'os en implantant une matrice phosphocalcique afin de maintenir le capital osseux du patient et (2) de participer à la gestion de la douleur en libérant localement la bupivacaïne. Pour les mêmes raisons évoquées précédemment, nous avons choisi d'utiliser la CDA comme phase phosphocalcique vectrice de la bupivacaïne afin de

valider notre approche analgésique locale. Les premiers résultats *in vivo* mettent en évidence l'efficacité analgésique à court terme de notre approche locale (article 3). Actuellement, nous travaillons à l'amélioration du vecteur phosphocalcique et à la modélisation *in vivo* de la douleur postopératoire.

L'ensemble de nos résultats tendent à montrer que nos dispositifs phosphocalciques combinés présentent un intérêt en chirurgie de reconstruction osseuse. Nos données concordent avec celles de la littérature qui décrivent par exemple, l'efficacité des PCa associés à des antibiotiques dans la prévention des infections osseuses. Conscients de l'apport des systèmes combinés en chirurgie orthopédique, nous avons recherché des agents thérapeutiques pouvant être associés avec des PCa. Nous nous sommes intéressés au gallium (Ga), qui est susceptible non seulement de se substituer partiellement au calcium dans les structures cristallines des PCa mais aussi de présenter un potentiel d'inhibition de la résorption ostéoclastique. L'absence de données concordantes dans la littérature concernant les effets du Ga sur les cellules osseuses nous a amené à clarifier, dans un premier temps, l'activité biologique du Ga. L'ensemble de nos résultats indique que le Ga inhibe l'activité de résorption en bloquant la différenciation et la formation ostéoclastiques sans affecter la viabilité et l'activité des ostéoblastes (article 4). Ces données biologiques justifient l'intérêt de poursuivre notre approche locale de prévention des fractures ostéoporotiques en développant un nouveau dispositif phosphocalcique combiné à base de Ga.

Actuellement ces biomatériaux combinés à des molécules actives suscitent un engouement en chirurgie de reconstruction osseuse que ce soit pour renforcer la stabilité des prothèses, pour prévenir les risques d'infections osseuses ou encore les récurrences des tumeurs ostéolytiques. Ces systèmes sont également envisagés pour améliorer le potentiel ostéogénique des substituts osseux classiquement utilisés, en incorporant notamment des hormones et facteurs de croissance tels que la BMP-2^{307,308}. Cependant, ces protéines sont fragiles et pourraient générer des effets secondaires délétères. La vectorisation ciblée de leur ADN codant est une voie qui peut être envisagée pour permettre la synthèse *in situ* de ces facteurs sans être dégradés. La recherche s'oriente également vers le développement d'une nouvelle génération de biomatériaux combinés dans lesquels des cellules ostéoprogénitrices seraient ajoutées à ces facteurs de croissance de façon à recréer un microenvironnement propice à la néoformation osseuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hsiong S, Mooney D. Regeneration of vascularized bone. *Periodontol.* 2000;41:109-122.
2. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008;15:100-14.
3. Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):s571-8.
4. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):s601-9.
5. Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 2002;25(5 Suppl):s561-70.
6. Seiler JG, 3rd, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 2000;9(2):91-7.
7. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S20-7.
8. Daculsi G, Laboux O, Weiss P. Calcium Phosphate Bioceramics. An alternative to autograft and allograft? In: Quarto HPA, editor. *Tissue engineering approach to bone repair*: Landes Biosciences; 2002.
9. Rougraff BT. Bone graft alternatives in the treatment of benign bone tumors. *Instr Course Lect* 2005;54:505-12.
10. Malard O, Guicheux J, Bouler JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aguado E, Pilet P, LeGeros R, Daculsi G. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005;36(2):323-30.
11. Malard O, Espitalier F, Bordure P, Daculsi G, Weiss P, Corre P. Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck. *Expert Rev Med Devices* 2007;4(5):729-39.
12. Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 2000(372):139-50.
13. Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporos Int* 1999;9 Suppl 2:S66-80.
14. Reuben S, Buvanendran A. Preventing the development of chronic pain after orthopaedic surgery with preventive multimodal analgesic techniques. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(6):1343-58.
15. Pasero C, McCaffery M. Orthopaedic postoperative pain management. *J Perianesth Nurs* 2007;22(3):160-72; quiz 172-3.
16. Toppets V, Pastoret V, De Behr V, Antoine N, Dessy C, Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét.* 2004;147:1-13.
17. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19(3):180-92.
18. Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/sciences* 2001;17:1252-9.
19. Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci* 2007;12:1450-62.
20. Marks S, Odgren P. Structure and development of the skeleton; 2002. 3-15 p.
21. You L TS, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, Kingery W, Malone AM, Kwon RY, Jacobs CR. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008;42(1):172-9.
22. Baron R. L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *Médecine/sciences* 2001;17:1260-9.

23. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 3):377-81.
24. Mulari MT, Zhao H, Lakkakorpi PT, Vaananen HK. Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 2003;4(2):113-25.
25. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7(1-2):123-39.
26. Marieb E, Lachaine R. *Biologie Humaine: Anatomie et physiologie: De Boeck Université*; 2000. 560 p.
27. Benhamou CL. Effects of osteoporosis medications on bone quality. *Joint Bone Spine* 2007;74(1):39-47.
28. Parfitt AM MC, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest.* 1983;72(4):1396-409.
29. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor-- a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992;13(4):327-30.
30. Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 2006;39(6):1173-81.
31. Bouxsein ML. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporos Int* 2003;14 Suppl 5:S118-27.
32. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61(5):577-87.
33. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 2002;30(4):533-40.
34. Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995.
35. Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32(1):15-24.
36. Rosen CJ. Pathogenesis of osteoporosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14(2):181-93.
37. Cohen-Solal M, de Vernejoul MC. [Bone remodeling]. *Therapie* 2003;58(5):391-3.
38. Marie P, Debiais F, Cohen-Solal M, de Vernejoul MC. New factors controlling bone remodeling. *Joint Bone Spine* 2000;67(3):150-6.
39. Kleerekoper M VA, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(6):594-7.
40. Deramond H, Mathis JM. Vertebroplasty in osteoporosis. *Semin Musculoskelet Radiol* 2002;6(3):263-8.
41. Kim CW, Minocha J, Wahl CE, Garfin SR. Response of fractured osteoporotic bone to polymethylacrylate after vertebroplasty: case report. *Spine J* 2004;4(6):709-12.
42. Services UDoHaH. *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General.* Rockville, MD: US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General 2004.
43. Petite H. La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Médecine/Sciences* 2002;18:995-1002.

44. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res* 1986(205):269-91.
45. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71(6):354-61.
46. 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;25(2 Suppl):59S-61S.
47. Parikh S. Bone graft substitutes in modern orthopedics. *orthopedics* 2002;25(11):1301-1310.
48. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop* 2002;395:81-98.
49. LeGeros RZ. Calcium phosphate in oral biology and medicine. *Monographs in oral sciences* 1991;15.
50. Bourgeois B, Laboux O, Obadia L, Gauthier O, Betti E, Aguado E, Daculsi G, Bouler JM. Calcium-deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth. *J Biomed Mater Res* 2003;65A(3):402-8.
51. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(698):893-9.
52. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50(6):1392-406.
53. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1983;14:65-88.
54. Anderson JM MK. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 1984;26(12):1445-51.
55. Minkin C, Marinho VC. Role of the osteoclast at the bone-implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13:49-56.
56. Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater* 2008;4(1):139-48.
57. Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 2005;26(12):1445-51.
58. Ducheyne P, Cuckler JM. Bioactive ceramic prosthetic coatings. *Clin Orthop Relat Res* 1992(276):102-14.
59. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19(1-3):133-9.
60. Rush S. Bone graft substitutes: osteobiologics. *Clin Podiatric Medicine and Surgery* 2005;22:619-630.
61. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997;18(15):1037-41.
62. Daculsi G, LeGeros RZ, Deudon C. Scanning and transmission electron microscopy, and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. *Osseocoalescence versus osseo-integration. Scanning Microsc* 1990;4(2):309-14.
63. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005;26(33):6423-9.
64. Carey LE, Xu HH, Simon CG, Jr., Takagi S, Chow LC. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. *Biomaterials* 2005;26(24):5002-14.

65. LeGeros RZ, Chohayeb A, Shulman A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. *J.Dent.Res.* 1982;61:343.
66. Khairoun I, Boltong MG, Driessens FC, Planell JA. Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement. *Biomaterials* 1997;18(23):1535-9.
67. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000;31 Suppl 4:37-47.
68. Brown WE, Chow LC. Dental restorative cement paste. Patent US.4, 518, 430 1985.
69. Chow LC. Development of self-setting calcium phosphate cements. *J.Ceram.Soc.Japan, Int.* 1992;99:927-936.
70. Khairoun I, Magne D, Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, Weiss P. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):633-42.
71. Khairoun I, Driessens FC, Boltong MG, Planell JA, Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1999;20(4):393-8.
72. Fernandez E, Vlad MD, Gel MM, Lopez J, Torres R, Cauich JV, Bohner M. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of alpha-tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures. *Biomaterials* 2005;26(17):3395-404.
73. Chow LC, Takagi S, Constantino PD, Friedman DD. Self-setting calcium phosphate cements. *Mater.Res.Soc.Symp.Proc.* 1991;179:3-24.
74. Fukase Y, Eanes EE, Takagi S, Chow LC, Brown WE. Setting reactions and compressive strength of calcium phosphate cements. *J.Dent.Res.* 1990;69:1852-1856.
75. Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25(1):97-106.
76. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94(6):646-50.
77. Fontana A, Delmas PD. L'ostéoporose: épidémiologie, clinique et approches thérapeutiques. *Médecine/sciences* 2001;17:1297-305.
78. Ostéoporose: facteurs de risque et fractures. *La lettre de l'observatoire du mouvement* 2002;5:1-10.
79. Burlet N, Thomas T, Delmas PD. Le pharmacien et l'ostéoporose. *Cespharm: Ordre National des Pharmaciens*; 2007.
80. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Shindle MK, Griffith MH, Lane JM. Osteoporosis and skeletal fractures. *Hss J* 2006;2(1):62-9.
81. Altizer LL. Colles' fracture. *Orthop Nurs* 2008;27(2):140-5; quiz 146-7.
82. Lips P, van Schoor NM. Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005;16(5):447-55.
83. Haczynski J, Jakimiuk A. Vertebral fractures: a hidden problem of osteoporosis. *Med Sci Monit.* 2001;7(5):1108-17.
84. Cooper C, Atkinson E, O'Fallon W, Melton L. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res.* 1992;7(2):221-7.
85. Boonen S, Autier P, Barette M, Vanderschueren D, Lips P, Haentjens P. Functional outcome and quality of life following hip fracture in elderly women: a prospective controlled study. *Osteoporos Int* 2004;15(2):87-94.
86. Randell AG, Nguyen TV, Bhalerao N, Silverman SL, Sambrook PN, Eisman JA. Deterioration in quality of life following hip fracture: a prospective study. *Osteoporos Int* 2000;11(5):460-6.

87. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *Jama* 2009;301(5):513-21.
88. Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, Hanley DA, Barton I, Broy SB, Licata A, Benhamou L, Geusens P, Flowers K, Stracke H, Seeman E. Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *Jama* 2001;285(3):320-3.
89. Empana JP, Dargent-Molina P, Breart G. Effect of hip fracture on mortality in elderly women: the EPIDOS prospective study. *J Am Geriatr Soc* 2004;52(5):685-90.
90. van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone* 2001;29(6):517-22.
91. Lin PC, Chang SY. Functional recovery among elderly people one year after hip fracture surgery. *J Nurs Res* 2004;12(1):72-82.
92. Devlin H, Allen P, Graham J, Jacobs R, Nicopoulou-Karayianni K, Lindh C, Marjanovic E, Adams J, Pavitt S, van der Stelt P, Horner K. The role of the dental surgeon in detecting osteoporosis: the OSTEODENT study. *Br Dent J* 2008;204(10):E16; discussion 560-1.
93. Nicopoulou-Karayianni K, Tzoutzoukos P, Mitsea A, Karayiannis A, Tsiklakis K, Jacobs R, Lindh C, van der Stelt P, Allen P, Graham J, Horner K, Devlin H, Pavitt S, Yuan J. Tooth loss and osteoporosis: the osteodent study. *J Clin Periodontol* 2009;36(3):190-7.
94. Organisation Mondiale de la Santé. www.who.int.
95. International Osteoporosis Foundation. www.iofbonehealth.org.
96. Rapport sur l'ostéoporose dans la Communauté Européenne. Actions de prévention. Luxembourg: Communautés européennes; 1999.
97. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 2002;359(9321):1929-36.
98. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 1996;18(312):1254-9.
99. Laugier P, Padilla F, Peyrin F, Raum K, Saied A, Talmant M, Vico L. Current trends in the ultrasonic investigation of bone. *ITBM-RTM* 2005;26:299-311.
100. Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM, Sebert JL, Cormier C, Kotzki PO, Delmas PD, Pouilles JM, Breart G, Meunier PJ. Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet* 1996;348(9026):511-4.
101. Bauer DC, Gluer CC, Cauley JA, Vogt TM, Ensrud KE, Genant HK, Black DM. Broadband ultrasound attenuation predicts fractures strongly and independently of densitometry in older women. A prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1997;157(6):629-34.
102. Jeandel C. Postmenopausal osteoporosis diagnostic methods and their indications. *Rev Med Interne* 2004;25 Suppl 5:S538-42.
103. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA, 3rd, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res* 2000;15(4):721-39.
104. Nguyen ND, Frost SA, Center JR, Eisman JA, Nguyen TV. Development of prognostic nomograms for individualizing 5-year and 10-year fracture risks. *Osteoporos Int* 2008;19(10):1431-44.
105. AFFSAPS. Traitement médicamenteux de l'ostéoporose post-ménopausique. Recommandations 2006.

106. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int* 2008;19(4):385-97.
107. Gass M, Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. *Am J Med* 2006;119(4 Suppl 1):S3-S11.
108. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Shindle MK, Griffith MH, Lane JM. Prevention and treatment of osteoporotic fractures. *Minerva Med* 2005;96(5):343-52.
109. Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21(1):109-22.
110. Epstein S. Update of current therapeutic options for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *clinical therapeutics* 2006;28(2):151-173.
111. Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin G, Feyen JH, Lakatos P. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul* 2003;37(4):225-38.
112. Chaiamnuay S, Saag KG. Postmenopausal osteoporosis. What have we learned since the introduction of bisphosphonates? *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7(1-2):101-12.
113. DOROSZ. Guide pratique des médicaments; 2005.
114. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 2002;359(9322):2018-26.
115. Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966;212(65):901-3.
116. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9(32):2643-58.
117. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 1999;24(5 Suppl):73S-79S.
118. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88(12 Suppl):2961-78.
119. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 2006;69(5):1624-32.
120. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, Zannettino AC. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004;19(1):147-54.
121. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25(18):4105-15.
122. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;60(21):6001-7.
123. Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002;25(6):539-46.
124. von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbhag AS. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26(34):6941-9.
125. Le dictionnaire VIDAL; 2007.

126. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996;18(2):75-85.
127. Lin JH, Russell G, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate: an overview. *Int J Clin Pract Suppl* 1999;101:18-26.
128. Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet* 1999;36(5):315-28.
129. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW, Jr., Dequeker J, Favus M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med* 1995;333(22):1437-43.
130. Tonino RP, Meunier PJ, Emkey R, Rodriguez-Portales JA, Menkes CJ, Wasnich RD, Bone HG, Santora AC, Wu M, Desai R, Ross PD. Skeletal benefits of alendronate: 7-year treatment of postmenopausal osteoporotic women. Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(9):3109-15.
131. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350(12):1189-99.
132. Schnitzer T, Bone HG, Crepaldi G, Adami S, McClung M, Kiel D, Felsenberg D, Recker RR, Tonino RP, Roux C, Pinchera A, Foldes AJ, Greenspan SL, Levine MA, Emkey R, Santora AC, 2nd, Kaur A, Thompson DE, Yates J, Orloff JJ. Therapeutic equivalence of alendronate 70 mg once-weekly and alendronate 10 mg daily in the treatment of osteoporosis. Alendronate Once-Weekly Study Group. *Aging (Milano)* 2000;12(1):1-12.
133. Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, Widmer A, Devogelaer JP, Kaufman JM, Jaeger P, Body JJ, Brandi ML, Broell J, Di Micco R, Genazzani AR, Felsenberg D, Happ J, Hooper MJ, Ittner J, Leb G, Mallmin H, Murray T, Ortolani S, Rubinacci A, Saaf M, Samsioe G, Verbruggen L, Meunier PJ. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2002;346(9):653-61.
134. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;356(18):1809-22.
135. Lyles KW, Colon-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L, Moore KA, Lavecchia C, Zhang J, Mesenbrink P, Hodgson PK, Abrams K, Orloff JJ, Horowitz Z, Eriksen EF, Boonen S. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 2007;357(18):1799-809.
136. Devogelaer JP, Brown JP, Burckhardt P, Meunier PJ, Goemaere S, Lippuner K, Body JJ, Samsioe G, Felsenberg D, Fashola T, Sanna L, Ortmann CE, Trechsel U, Krasnow J, Eriksen EF, Garnero P. Zoledronic acid efficacy and safety over five years in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2007;18(9):1211-8.

137. McClung MR, Wasnich RD, Hosking DJ, Christiansen C, Ravn P, Wu M, Mantz AM, Yates J, Ross PD, Santora AC. Prevention of postmenopausal bone loss: six-year results from the Early Postmenopausal Intervention Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(10):4879-85.
138. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Bauer DC, Genant HK, Haskell WL, Marcus R, Ott SM, Torner JC, Quandt SA, Reiss TF, Ensrud KE. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 1996;348(9041):1535-41.
139. Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, Palermo L, Prineas R, Rubin SM, Scott JC, Vogt T, Wallace R, Yates AJ, LaCroix AZ. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *Jama* 1998;280(24):2077-82.
140. Gallagher AM, Rietbrock S, Olson M, van Staa TP. Fracture outcomes related to persistence and compliance with oral bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008;23(10):1569-75.
141. Recker RR, Delmas PD, Halse J, Reid IR, Boonen S, Garcia-Hernandez PA, Supronik J, Lewiecki EM, Ochoa L, Miller P, Hu H, Mesenbrink P, Hartl F, Gasser J, Eriksen EF. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner Res* 2008;23(1):6-16.
142. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007;22(10):1479-91.
143. Grbic JT, Landesberg R, Lin SQ, Mesenbrink P, Reid IR, Leung PC, Casas N, Recknor CP, Hua Y, Delmas PD, Eriksen EF. Incidence of osteonecrosis of the jaw in women with postmenopausal osteoporosis in the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly pivotal fracture trial. *J Am Dent Assoc* 2008;139(1):32-40.
144. Woo SB, Kalmar JR. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. *Alpha Omegan* 2007;100(4):194-202.
145. Reach G. Application of the causal theory of action through analysis of therapeutic non-observance. *Presse Med.* 2000;29(35):1939-46.
146. Segal E, Tamir A, Ish-Shalom S. Compliance of osteoporotic patients with different treatment regimens. *Isr Med Assoc J* 2003;5(12):859-62.
147. Rabenda V, Vanoverloop J, Fabri V, Mertens R, Sumkay F, Vannecke C, Deswaef A, Verpooten GA, Reginster JY. Low incidence of anti-osteoporosis treatment after hip fracture. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(10):2142-8.
148. Penning-van Beest FJ, Erkens JA, Olson M, Herings RM. Determinants of non-compliance with bisphosphonates in women with postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2008;24(5):1337-44.
149. Clowes JA, Peel NF, Eastell R. The impact of monitoring on adherence and persistence with antiresorptive treatment for postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(3):1117-23.

150. Huybrechts KF, Ishak KJ, Caro JJ. Assessment of compliance with osteoporosis treatment and its consequences in a managed care population. *Bone* 2006;38(6):922-8.
151. Siris ES, Harris ST, Rosen CJ, Barr CE, Arvesen JN, Abbott TA, Silverman S. Adherence to bisphosphonate therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases. *Mayo Clin Proc* 2006;81(8):1013-22.
152. Caro JJ, Ishak KJ, Huybrechts KF, Raggio G, Naujoks C. The impact of compliance with osteoporosis therapy on fracture rates in actual practice. *Osteoporos Int* 2004;15(12):1003-8.
153. Blouin J, Dragomir A, Moride Y, Ste-Marie LG, Fernandes JC, Perreault S. Impact of noncompliance with alendronate and risedronate on the incidence of nonvertebral osteoporotic fractures in elderly women. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66(1):117-27.
154. Sunycz JA, Mucha L, Baser O, Barr CE, Amonkar MM. Impact of compliance and persistence with bisphosphonate therapy on health care costs and utilization. *Osteoporos Int* 2008;19(10):1421-9.
155. Emkey RD, Ettinger M. Improving compliance and persistence with bisphosphonate therapy for osteoporosis. *Am J Med* 2006;119(4 Suppl 1):S18-24.
156. Sambrook P. Compliance with treatment in osteoporosis patients--an ongoing problem. *Aust Fam Physician* 2006;35(3):135-7.
157. Hamilton B, McCoy K, Taggart H. Tolerability and compliance with risedronate in clinical practice. *Osteoporos Int* 2003;14(3):259-62.
158. Rabenda V, Mertens R, Fabri V, Vanoverloop J, Sumkay F, Vannecke C, Deswaef A, Verpooten GA, Reginster JY. Adherence to bisphosphonates therapy and hip fracture risk in osteoporotic women. *Osteoporos Int* 2008;19(6):811-8.
159. Cramer JA, Gold DT, Silverman SL, Lewiecki EM. A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis. *Osteoporos Int* 2007;18(8):1023-31.
160. Miller PD, McClung MR, Macovei L, Stakkestad JA, Luckey M, Bonvoisin B, Reginster JY, Recker RR, Hughes C, Lewiecki EM, Felsenberg D, Delmas PD, Kendler DL, Bolognese MA, Mairon N, Cooper C. Monthly oral ibandronate therapy in postmenopausal osteoporosis: 1-year results from the MOBILE study. *J Bone Miner Res* 2005;20(8):1315-22.
161. Lewiecki EM, Babbitt AM, Piziak VK, Ozturk ZE, Bone HG. Adherence to and gastrointestinal tolerability of monthly oral or quarterly intravenous ibandronate therapy in women with previous intolerance to oral bisphosphonates: a 12-month, open-label, prospective evaluation. *Clin Ther* 2008;30(4):605-21.
162. Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J, Pettinger M, Stefanick ML, Wactawski-Wende J, Watts NB. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama* 2003;290(13):1729-38.
163. Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet* 2003;362(9382):428-32.
164. Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SA, Pettinger M, Liu J, McNeeley SG, Lopez AM. Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama* 2003;290(13):1739-48.

165. Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hoszowski K, Rautaharju P, Harper KD. Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *Jama* 2002;287(7):847-57.
166. Delmas PD, Ensrud KE, Adachi JD, Harper KD, Sarkar S, Gennari C, Reginster JY, Pols HA, Recker RR, Harris ST, Wu W, Genant HK, Black DM, Eastell R. Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3609-17.
167. Chestnut CH, Silverman S, Andriano K. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. *Am. J. Med.* 2000;109:267-276.
168. Cummings SR, Chapurlat RD. What PROOF proves about calcitonin and clinical trials. *Am J Med* 2000;109(4):330-1.
169. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344(19):1434-41.
170. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001;28:446-453.
171. Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int.* 2005;16 Suppl 1:S7-10.
172. Naveau B. Le strontium: un nouveau traitement de l'ostéoporose. *Rev Rhum* 2004;71:549-551.
173. Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Diaz-Curiel M, Compston J, Marquis P, Cormier C, Isaia G, Badurski J, Wark JD, Collette J, Reginster JY. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2009.
174. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001;16(2):348-60.
175. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004;19(7):1059-66.
176. Miller PD. Denosumab: anti-RANKL antibody. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7(1):18-22.
177. Josse S, Faucheux C, Soueidan A, Grimandi G, Massiot D, Alonso B, Janvier P, Laib S, Pilet P, Gauthier O, Daculsi G, Guicheux JJ, Bujoli B, Bouler JM. Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. *Biomaterials* 2005;26(14):2073-80.
178. Roussière H, Fayon F, Alonso B, Rouillon T, Schnitzler V, Verron E, Guicheux J, Petit M, Massiot D, Janvier P, Bouler JM, Bujoli B. Reaction of Zoledronate with b-Tricalcium Phosphate for the Design Of Potential Drug Device Combined Systems. *Chemistry of Materials* 2008;20:182-191.
179. Josse S, Faucheux C, Grimandi G, Massiot A, Alonso B, Janvier P, Pilet P, Gauthier O, Daculsi G, Guicheux J, Bujoli B, Bouler JM. An innovative strategy for local treatment of bone resorption and prevention of osteoporotic fractures. *Adv Mater* 2004;16(16):1423-1427.

180. Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2008;29(7):790-6.
181. Denissen H, Van Beek E, Lowik C, Papapoulos S, Van den Hoof A. Ceramic hydroxyapatite implants for the release of bisphosphonate. *Bone Miner* 1994;25:123-134.
182. Seshima H, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Inoue T, Oda Y. Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;78(2):215-21.
183. Peter B, Gauthier O, Laib S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P, van Lenthe GH, Muller R, Zambelli PY, Bouler JM, Pioletti DP. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(1):133-43.
184. Shi X, Wang Y, Ren L, Gong Y, Wang DA. Enhancing Alendronate Release from a Novel PLGA/Hydroxyapatite Microspheric System for Bone Repairing Applications. *Pharmaceutical Research* 2009;26(2).
185. Roussiere H, Montavon G, Laib S, Janvier P, Alonso B, Fayon F, Petit M, Massiot D, Bouler JM, Bujoli B. Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption. *J Mater Chem* 2005;15:3869-3875.
186. Grimandi G, Soueidan A, Anjrini AA, Badran Z, Pilet P, Daculsi G, Fauchoux C, Bouler JM, Guicheux J. Quantitative and reliable in vitro method combining scanning electron microscopy and image analysis for the screening of osteotropic modulators. *Microsc Res Tech* 2006;69((8)):606-12.
187. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104(10):1363-74.
188. Kalu D. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1999;15:175-92.
189. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992;18(3):227-36.
190. Erben RG, Mosekilde L, Thomsen JS, Weber K, Stahr K, Leyshon A, Smith SY, Phipps R. Prevention of bone loss in ovariectomized rats by combined treatment with risedronate and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Bone Miner Res* 2002;17(8):1498-511.
191. Ito M, Azuma Y, Takagi H, Kamimura T, Komoriya K, Ohta T, Kawaguchi H. Preventive effects of sequential treatment with alendronate and 1 alpha-hydroxyvitamin D3 on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* 2003;33(1):90-9.
192. Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW. Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone* 1995;17(4 Suppl):395S-402S.
193. Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU. Dose-response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone* 1995;17(4 Suppl):421S-427S.

194. Chavassieux P, Garnero P, Duboeuf F, Vergnaud P, Brunner-Ferber F, Delmas PD, Meunier PJ. Effects of a new selective estrogen receptor modulator (MDL 103,323) on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes: a biochemical, histomorphometric, and densitometric study. *J Bone Miner Res* 2001;16(1):89-96.
195. Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, Johnson RB, Zardiackas LD. The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *J Comp Pathol* 2004;130(4):323-6.
196. Denissen H, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A. Normal osteoconduction and repair in and around submerged highly bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants in rat tibiae. *J Periodontol* 2000;71(2):272-8.
197. Denissen H, Montanari C, Martinetti R, van Lingen A, van den Hooff A. Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. *J Periodontol* 2000;71(2):279-86.
198. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli PY, Bouler JM, Gauthier O. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36(1):52-60.
199. Wahl RL, Waldmann S, Shapiro B. Dual-photon bone mineral density in the proximal femur: correlation by site. *Nucl Med Commun* 1988;9(1):53-8.
200. Pouilles JM, Tremollieres F, Ribot C. [Measurement of femoral bone density using dual photon absorptiometry. Values in osteoporosis]. *J Radiol* 1992;73(8-9):429-35.
201. Trivitayaratana W, Trivitayaratana P, Kongkiatikul S. Prediction of bone mineral density of lumbar spine, hip, femoral neck and Ward's triangle by forearm bone mineral density. *J Med Assoc Thai* 2001;84(3):390-6.
202. Siu WS, Qin L, Cheung WH, Leung KS. A study of trabecular bones in ovariectomized goats with micro-computed tomography and peripheral quantitative computed tomography. *Bone* 2004;35(1):21-6.
203. Wu ZX, Lei W, Hu YY, Wang HQ, Wan SY, Ma ZS, Sang HX, Fu SC, Han YS. Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Med Eng Phys* 2008;30(9):1112-8.
204. Mitra E, Rubin C, Qin YX. Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. *J Biomech* 2005;38(6):1229-37.
205. Mitra E, Rubin C, Gruber B, Qin YX. Evaluation of trabecular mechanical and microstructural properties in human calcaneal bone of advanced age using mechanical testing, microCT, and DXA. *J Biomech* 2008;41(2):368-75.
206. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Predicting human vertebral bone strength by vertebral static histomorphometry. *Bone* 2002;30(3):502-8.
207. Panzavolta S, Torricelli P, Bracci B, Fini M, Bigi A. Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. *J Inorg Biochem* 2009;103(1):101-6.
208. www.institut-upsa-douleur.org.
209. Mach D, Rogers S, Sabino M, Luger N, Schwei M, Pomonis J, Keyser C, Clohisy D, Adams D, O'Leary P, Mantyh P. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*. 2002;113(1):155-66.
210. Chenu C. Innervation de l'os. *Médecine/Sciences* 2001;17:1276-80.
211. Serre C, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone* 1999;25(6):623-9.
212. Sluka KA. Pain mechanisms involved in musculoskeletal disorders. *J Orthop Sports Phys Ther* 1996;24(4):240-54.

213. Melzack R,Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL. Central neuroplasticity and pathological pain. *Ann N Y Acad Sci* 2001;933:157-74.
214. Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 1992;15(3):96-103.
215. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005;72(5):359-71.
216. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 2005;67:259-84.
217. Dahl V, Raeder C. Non-opioid postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007;44:1191-1203.
218. Strom BL, Berlin JA, Kinman JL, Spitz PW, Hennessy S, Feldman H, Kimmel S, Carson JL. Parenteral ketorolac and risk of gastrointestinal and operative site bleeding. A postmarketing surveillance study. *Jama* 1996;275(5):376-82.
219. Forrest JB, Camu F, Greer IA, Kehlet H, Abdalla M, Bonnet F, Ebrahim S, Escolar G, Jage J, Pocock S, Velo G, Langman MJ, Bianchi PG, Samama MM, Heitlinger E. Ketorolac, diclofenac, and ketoprofen are equally safe for pain relief after major surgery. *Br J Anaesth* 2002;88(2):227-33.
220. Celerier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P, Simonnet G. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 2000;92(2):465-72.
221. Manoir BD, Bourget P, Langlois M, Szekely B, Fischler M, Chauvin M, Paci A, Fletcher D. Evaluation of the pharmacokinetic profile and analgesic efficacy of oral morphine after total hip arthroplasty. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23(9):748-54.
222. Butterworth JF 4th SG. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology*. 1990;72(4):711-34.
223. Yanagitate F, Strichartz G. Local anesthetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;177:95-127.
224. Tortora GJ, Grabowski SR. Principes d'anatomie et de physiologie. Partie III Les systèmes de régulations du corps Humain. Chap 12 Le système nerveux: De Boeck Université; 2002. 1256 p.
225. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 2000;93(3):858-75.
226. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.Review*. 2006;50(3):265-82.
227. Huet O, Eyrolle LJ, Mazoit JX, Ozier YM. Cardiac arrest after injection of ropivacaine for posterior lumbar plexus blockade. *Anesthesiology* 2003;99(6):1451-3.
228. Chazalon P, Tourtier JP, Villevielle T, Giraud D, Saïssy JM, Mion G, Benhamou D. Ropivacaine-induced cardiac arrest after peripheral nerve block: successful resuscitation. *Anesthesiology* 2003;99(6):1449-51.
229. Menigaux C, Fletcher D, Dupont X, Guignard B, Guirimand F, Chauvin M. The benefits of intraoperative small-dose ketamine on postoperative pain after anterior cruciate ligament repair. *Anesth Analg* 2000;90(1):129-35.
230. Menigaux C, Guignard B, Fletcher D, Sessler DI, Dupont X, Chauvin M. Intraoperative small-dose ketamine enhances analgesia after outpatient knee arthroscopy. *Anesth Analg* 2001;93(3):606-12.

231. Adam F, Chauvin M, Du Manoir B, Langlois M, Sessler DI, Fletcher D. Small-dose ketamine infusion improves postoperative analgesia and rehabilitation after total knee arthroplasty. *Anesth Analg* 2005;100(2):475-80.
232. Ing K, Dayer P, Desmeules J. Is there a rationale for combining paracetamol with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Doul. et Analg.* 2005;3:59-62.
233. Hyllested M, Jones S, Pedersen JL, Kehlet H. Comparative effect of paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management: a qualitative review. *Br J Anaesth* 2002;88(2):199-214.
234. Fletcher D, Negre I, Barbin C, Francois A, Carreres C, Falgueirettes C, Barboteu A, Samii K. Postoperative analgesia with i.v. propacetamol and ketoprofen combination after disc surgery. *Can J Anaesth* 1997;44(5 Pt 1):479-85.
235. McQuay H, Edwards J. Meta-analysis of single dose oral tramadol plus acetaminophen in acute postoperative pain. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2003;28:19-22.
236. Khoury CE, Dagher C, Ghanem I, Naccache N, Jawish D, Yazbeck P. Combined regional and general anesthesia for ambulatory peripheral orthopedic surgery in children. *J Pediatr Orthop B* 2008.
237. Remy C, Marret E, Bonnet F. Effects of acetaminophen on morphine side-effects and consumption after major surgery: meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Anaesth* 2005;94(4):505-13.
238. Aubrun F, Kalfon F, Mottet P, Bellanger A, Langeron O, Coriat P, Riou B. Adjunctive analgesia with intravenous propacetamol does not reduce morphine-related adverse effects. *Br J Anaesth* 2003;90(3):314-9.

239. Delage N, Maaliki H, Beloeil H, Benhamou D, Mazoit JX. Median effective dose (ED50) of nefopam and ketoprofen in postoperative patients: a study of interaction using sequential analysis and isobolographic analysis. *Anesthesiology* 2005;102(6):1211-6.
240. Du Manoir B, Aubrun F, Langlois M, Le Guern ME, Alquier C, Chauvin M, Fletcher D. Randomized prospective study of the analgesic effect of nefopam after orthopaedic surgery. *Br J Anaesth* 2003;91(6):836-41.
241. Schulte H, Sollevi A, Segerdahl M. The synergistic effect of combined treatment with systemic ketamine and morphine on experimentally induced windup-like pain in humans. *Anesth Analg* 2004;98(6):1574-80, table of contents.
242. Capdevila X, Barthelet Y, Biboulet P, Ryckwaert Y, Rubenovitch J, d'Athis F. Effects of perioperative analgesic technique on the surgical outcome and duration of rehabilitation after major knee surgery. *Anesthesiology* 1999;91(1):8-15.
243. Richman JM, Liu SS, Courpas G, Wong R, Rowlingson AJ, McGready J, Cohen SR, Wu CL. Does continuous peripheral nerve block provide superior pain control to opioids? A meta-analysis. *Anesth Analg* 2006;102(1):248-57.
244. Pham Dang C, Gautheron E, Guilley J, Fernandez M, Waast D, Volteau C, Nguyen JM, Pinaud M. The value of adding sciatic block to continuous femoral block for analgesia after total knee replacement. *Reg Anesth Pain Med* 2005;30(2):128-33.
245. Neuburger M, Buttner J, Blumenthal S, Breitbarth J, Borgeat A. Inflammation and infection complications of 2285 perineural catheters: a prospective study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007;51(1):108-14.
246. Neuburger M, Breitbarth J, Reisig F, Lang D, Buttner J. [Complications and adverse events in continuous peripheral regional anesthesia Results of investigations on 3,491 catheters]. *Anaesthesist* 2006;55(1):33-40.

247. Capdevila X, Pirat P, Bringuier S, Gaertner E, Singelyn F, Bernard N, Choquet O, Bouaziz H, Bonnet F. Continuous peripheral nerve blocks in hospital wards after orthopedic surgery: a multicenter prospective analysis of the quality of postoperative analgesia and complications in 1,416 patients. *Anesthesiology* 2005;103(5):1035-45.
248. Fuzier R, Fourcade O. [Peripheral nerve catheterization]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2006;25(1):84-8.
249. Heard SO, Edwards WT, Ferrari D, Hanna D, Wong PD, Liland A, Willock MM. Analgesic effect of intraarticular bupivacaine or morphine after arthroscopic knee surgery: a randomized, prospective, double-blind study. *Anesth Analg* 1992;74(6):822-6.
250. Singelyn FJ, Lhotel L, Fabre B. Pain relief after arthroscopic shoulder surgery: a comparison of intraarticular analgesia, suprascapular nerve block, and interscalene brachial plexus block. *Anesth Analg* 2004;99(2):589-92, table of contents.
251. Bianconi M, Ferraro L, Traina GC, Zanolli G, Antonelli T, Guberti A, Ricci R, Massari L. Pharmacokinetics and efficacy of ropivacaine continuous wound instillation after joint replacement surgery. *Br J Anaesth* 2003;91(6):830-5.
252. Bianconi M, Ferraro L, Ricci R, Zanolli G, Antonelli T, Giulia B, Guberti A, Massari L. The pharmacokinetics and efficacy of ropivacaine continuous wound instillation after spine fusion surgery. *Anesth Analg* 2004;98(1):166-72, table of contents.
253. Gottschalk A, Burmeister MA, Radtke P, Krieg M, Farokhzad F, Kreissl S, Strauss M, Standl T. Continuous wound infiltration with ropivacaine reduces pain and analgesic requirement after shoulder surgery. *Anesth Analg* 2003;97(4):1086-91, table of contents.
254. Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46(8):665-70.
255. Silber J, Anderson D, Daffner S, Brislin B, Leland J, Hilibrand A, Vaccaro A, Albert T. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 2003;28(2):134-9.
256. Sasso R, LeHuec J, Shaffrey C, Spine Interbody Research Group. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech.* 2005;18: S77-81.
257. Delawi D, Dhert WJ, Castelein RM, Verbout AJ, Oner FC. The incidence of donor site pain after bone graft harvesting from the posterior iliac crest may be overestimated: a study on spine fracture patients. *Spine* 2007;32(17):1865-8.
258. Eufinger H, Leppanen H. Iliac crest donor site morbidity following open and closed methods of bone harvest for alveolar cleft osteoplasty. *J Craniomaxillofac Surg* 2000;28(1):31-8.
259. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(5):716-20.
260. Dawson KH, Egbert MA, Myall RW. Pain following iliac crest bone grafting of alveolar clefts. *J Craniomaxillofac Surg* 1996;24(3):151-4.
261. Perry CW, Lowenstein A, Rothkopf DM. Ambulatory alveolar bone grafting. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(3):736-9; discussion 740.
262. Singh K, Phillips FM, Kuo E, Campbell M. A prospective, randomized, double-blind study of the efficacy of postoperative continuous local anesthetic infusion at the iliac crest bone graft site after posterior spinal arthrodesis: a minimum of 4-year follow-up. *Spine* 2007;32(25):2790-6.

263. Coulthard P, Oliver R, Khan Afridi KA, Jackson-Leech D, Adamson L, Worthington H. The efficacy of local anaesthetic for pain after iliac bone harvesting: a randomised controlled trial. *Int J Surg* 2008;6(1):57-63.
264. Blumenthal S, Dullenkopf A, Rentsch K, Borgeat A. Continuous infusion of ropivacaine for pain relief after iliac crest bone grafting for shoulder surgery. *Anesthesiology* 2005;102(2):392-7.
265. Nocini PF, Bedogni A, Valsecchi S, Trevisiol L, Ferrari F, Fior A, Saia G. Fractures of the iliac crest following anterior and posterior bone graft harvesting. Review of the literature and case presentation. *Minerva Stomatol* 2003;52(10):441-8, 448-52.
266. Hall TJ, Chambers TJ. Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts. *Bone Miner* 1990;8(3):211-6.
267. Donnelly R, Bockman RS, Doty SB, Boskey AL. Bone particles from gallium-treated rats are resistant to resorption in vivo. *Bone Miner* 1991;12(3):167-79.
268. Roussière H. Incorporation d'inhibiteurs de la résorption osseuse sur des matrices phosphocalciques. Nantes: Facult  de chirurgie dentaire; 2007. 264 p.
269. Korbas M, Rokita E, Meyer-Klaucke W, Ryzek J. Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite. *J Biol Inorg Chem* 2004;9(1):67-76.
270. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev* 1998;50(4):665-82.
271. Benezeth P, Diakonov, II, Pokrovski GS, Dandurand JL, Schott J, Khodakovsky IL. Gallium speciation in aqueous solution. Experimental study and modelling.2. Solubility of alpha-GaOOH in acidic solutions from 150 to 250 degrees C and hydrolysis constants of gallium (III) to 300 degrees C. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 1997;61(7):1345-1357.
272. Dudley HC, Maddox GE. Deposition of radio gallium (Ga72) in skeletal tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1949;96(3):224-7.
273. Nelson B, Hayes RL, Edwards CL, Kniseley RM, Andrews GA. Distribution of gallium in human tissues after intravenous administration. *J Nucl Med* 1972;13(1):92-100.
274. Samson MK, Fraile RJ, Baker LH, O'Bryan R. Phase I-II clinical trial of gallium nitrate (NSC-15200). *Cancer Clin Trials* 1980;3(2):131-6.
275. Kelsen DP, Alcock N, Yeh S, Brown J, Young C. Pharmacokinetics of gallium nitrate in man. *Cancer* 1980;46(9):2009-13.
276. Warrell RP, Jr., Israel R, Frisone M, Snyder T, Gaynor JJ, Bockman RS. Gallium nitrate for acute treatment of cancer-related hypercalcemia. A randomized, double-blind comparison to calcitonin. *Ann Intern Med* 1988;108(5):669-74.
277. Warrell RP, Jr., Skelos A, Alcock NW, Bockman RS. Gallium nitrate for acute treatment of cancer-related hypercalcemia: clinicopharmacological and dose response analysis. *Cancer Res* 1986;46(8):4208-12.
278. Chitambar CR. Gallium nitrate revisited. *Semin Oncol* 2003;30(2 Suppl 5):1-4.
279. Warrell RP, Jr., Bosco B, Weinerman S, Levine B, Lane J, Bockman RS. Gallium nitrate for advanced Paget disease of bone: effectiveness and dose-response analysis. *Ann Intern Med* 1990;113(11):847-51.
280. Matkovic V, Apseloff G, Shepard DR, Gerber N. Use of gallium to treat Paget's disease of bone: a pilot study. *Lancet* 1990;335(8681):72-5.
281. Niesvizky R. Gallium nitrate in multiple myeloma: prolonged survival in a cohort of patients with advanced-stage disease. *Semin Oncol* 2003;30(2 Suppl 5):20-4.

282. Einhorn L. Gallium nitrate in the treatment of bladder cancer. *Semin Oncol* 2003;30(2 Suppl 5):34-41.
283. Einhorn LH, Roth BJ, Ansari R, Dreicer R, Gonin R, Loehrer PJ. Phase II trial of vinblastine, ifosfamide, and gallium combination chemotherapy in metastatic urothelial carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12(11):2271-6.
284. Malfetano JH, Blessing JA, Adelson MD. A phase II trial of gallium nitrate (NSC #15200) in previously treated ovarian carcinoma. A Gynecologic Oncology Group Study. *Am J Clin Oncol* 1991;14(4):349-51.
285. Scher HI, Curley T, Geller N, Dershaw D, Chan E, Nisselbaum J, Alcock N, Hollander P, Yagoda A. Gallium nitrate in prostatic cancer: evaluation of antitumor activity and effects on bone turnover. *Cancer Treat Rep* 1987;71(10):887-93.
286. Collery P, Keppler B, Madoulet C, Desoize B. Gallium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42(3):283-96.
287. Manfait M, Collery P. Etude in vitro par spectroscopie raman de la conformation d'un ADN sous l'influence des ions magnésium et gallium. *Magnesium Bull* 1984;4:153-155.
288. Haq RU, Wereley JP, Chitambar CR. Induction of apoptosis by iron deprivation in human leukemic CCRF-CEM cells. *Exp Hematol* 1995;23(5):428-32.
289. Chitambar CR, Wereley JP, Matsuyama S. Gallium-induced cell death in lymphoma: role of transferrin receptor cycling, involvement of Bax and the mitochondria, and effects of proteasome inhibition. *Mol Cancer Ther* 2006;5(11):2834-43.
290. Chitambar CR, Zivkovic Z. Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin-independent mechanisms. *Cancer Res* 1987;47(15):3929-34.
291. Sohn MH, Jones BJ, Whiting JH, Datz FL, Lynch RE, Morton KA. Distribution of gallium-67 in normal and hypotransferrinemic tumor-bearing mice. *J Nucl Med* 1993;34(12):2135-43.
292. Chitambar CR, Sax D. Regulatory effects of gallium on transferrin-independent iron uptake by human leukemic HL60 cells. *Blood* 1992;80(2):505-11.
293. Bockman RS, Repo MA, Warrell RP, Jr., Pounds JG, Schidlovsky G, Gordon BM, Jones KW. Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron x-ray microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(11):4149-53.
294. Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Semin Oncol* 2003;30(2 Suppl 5):5-12.
295. Liewehr FR, Craft DW, Primack PD, Kulild JC, Turgeon DK, Sutherland DE, Schuster GS, Pashley DH. Effect of bisphosphonates and gallium on dentin resorption in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1995;11(1):20-6.
296. Lakatos P, Mong S, Stern PH. Gallium nitrate inhibits bone resorption and collagen synthesis in neonatal mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 1991;6(10):1121-6.
297. Blair HC, Teitelbaum SL, Tan HL, Schlesinger PH. Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-bound gallium (III). *J Cell Biochem* 1992;48(4):401-10.
298. Jenis LG, Waud CE, Stein GS, Lian JB, Baran DT. Effect of gallium nitrate in vitro and in normal rats. *J Cell Biochem* 1993;52(3):330-6.
299. Guidon PT, Jr., Salvatori R, Bockman RS. Gallium nitrate regulates rat osteoblast expression of osteocalcin protein and mRNA levels. *J Bone Miner Res* 1993;8(1):103-12.

300. Bockman RS, Guidon PT, Jr., Pan LC, Salvatori R, Kawaguchi A. Gallium nitrate increases type I collagen and fibronectin mRNA and collagen protein levels in bone and fibroblast cells. *J Cell Biochem* 1993;52(4):396-403.
301. Wakley GK, Garand J, Brown D, Szukalski BW, Bell NH, Turner RT. Effects of gallium on bone in the rat. *J Bone Miner Res* 1992;7(1):11-9.
302. Stern LS, Matkovic V, Weisbrode SE, Apseloff G, Shepard DR, Mays DC, Gerber N. The effects of gallium nitrate on osteopenia induced by ovariectomy and a low-calcium diet in rats. *Bone Miner* 1994;25(1):59-69.
303. Magne D, Faucheux C, Daculsi G, Guicheux J. Calcium phosphate ceramics as carrier for bone therapeutic agents. *Drug Discov Today* 2002;7(17):928-31.
304. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin biological activities. *Exp Cell Res* 2004;293(2):292-301.
305. Lorget F, Kamel S, Mentaverri R, Wattel A, Naassila M, Maamer M, Brazier M. High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268(3):899-903.
306. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Chattopadhyay N. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J Med Res* 2008;127(3):274-86.
307. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):329-45.
308. Dimar JR, Glassman SD, Burkus KJ, Carreon LY. Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine* 2006;31(22):2534-9; discussion 2540.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Marqueurs de la différenciation ostéoblastique ¹⁸	17
Figure 2: Structure de l'os ²⁶	21
Figure 3: Cycle du remodelage osseux	22
Figure 4: Bipolarité morphologique de l'ostéoclaste ³³	23
Figure 5: Régulation de l'ostéoclastogénèse ⁴²	26
Figure 6: Localisation des fractures ostéoporotiques ⁷⁸	39
Figure 7 : Stratégie thérapeutique en cas d'ostéoporose post-ménopausique en présence de fracture ¹⁰⁵	47
Figure 8: Stratégie thérapeutique de l'ostéoporose post-ménopausique en l'absence de fracture ¹⁰⁵	48
Figure 9: Structure du PPI et d'un bisphosphonate.....	49
Figure 10 : Structure des principaux bisphosphonates.....	50
Figure 11 : Amplification du message nociceptif	82
Figure 12 : Voies ascendantes de la douleur	84
Figure 13 : Cascade inflammatoire	87
Figure 14 : Blocage du canal Na ⁺ par la lidocaïne	92
Figure 15 : Structure de la procaïne	93
Figure 16 : Structure de la bupivacaïne.....	93
Figure 17: Répartition des espèces de Ga formées en solution selon le pH ²⁷¹	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Niveau de douleur en chirurgie orthopédique	79
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des anesthésiques locaux	93

ANNEXES

« Reaction of Zoledronate with b-Tricalcium Phosphate for the Design Of Potential Drug
Device Combined Systems »

H. Roussière, F. Fayon, B. Alonso, T. Rouillon, V. Schnitzler, **E. Verron**, J. Guicheux, M.
Petit, D. Massiot, P. Janvier, J.-M. Bouler, B. Bujoli.

Chemistry of Materials, 2008, 20, 182-191

Brevet N° 08290010.1-1219

« Analgesic apatitic calcium-phosphate cement »

H. Le Guen H, R. Cavagna, I. Khairoun, **E. Verron**, P. Janvier, O. Gauthier, JM. Boulter