UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Sciences des matériaux

Par
Manon DUPLEICHS

Développement de ciments phosphocalciques combinés à des agents d'intérêt thérapeutique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 novembre 2018
Unités de recherche : Laboratoire CEISAM, UMR CNRS 6230 – RmeS-lab, INSERM UMR 1229

Rapporteurs avant soutenance :

Marylène Viana, Professeure des universités, Université de Limoges
Stéphanie Sarda, Maître de conférences, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président du Jury : Thomas Le Corroler, Professeur des universités, Aix-Marseille Université

Directeur de thèse : Pascal Janvier, Maître de conférences, Université de Nantes
Co-directeur de thèse : Olivier Gauthier, Professeur des universités, Université de Nantes
Co-encadrant : Elise Verron, Maître de conférences, Université de Nantes

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Sciences des matériaux

Par
Manon DUPLEICHS

Développement de ciments phosphocalciques combinés à des agents d'intérêt thérapeutique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 novembre 2018
Unités de recherche : Laboratoire CEISAM, UMR CNRS 6230 – RmeS-lab, INSERM UMR 1229

Rapporteurs avant soutenance :

Marylène Viana, Professeure des universités, Université de Limoges
Stéphanie Sarda, Maître de conférences, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président du Jury : Thomas Le Corroler, Professeur des universités, Aix-Marseille Université

Directeur de thèse : Pascal Janvier, Maître de conférences, Université de Nantes
Co-directeur de thèse : Olivier Gauthier, Professeur des universités, Université de Nantes
Co-encadrant : Elise Verron, Maître de conférences, Université de Nantes

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire CEISAM (Chimie et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation) dirigé successivement par Monsieur Bruno Bujoli et Monsieur Jean-Michel Bouler et au Laboratoire RMeS (Regenerative Medicine and Skeleton) dirigé par Monsieur Pierre Wiess puis Monsieur Jérome Guicheux. Je tiens à les remercier pour m'avoir permise d'intégrer leur laboratoire durant ces trois années.

Je tiens à remercier Madame Marylène Viana, Professeur à la faculté de pharmacie de Limoges et Madame Stéphanie Sarda, Maitre de conférences à l'université Paul Sabatier de Toulouse de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse.

J'adresse également ma reconnaissance à Monsieur Thomas Le Corroller, Professeur à la faculté de Médecine de Marseille pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à mon directeur de thèse Pascal Janvier, à mon co-directeur Olivier Gauthier et à ma co-encadrante Elise Verron, pour m'avoir confié cette thèse. Merci beaucoup pour votre confiance, votre soutient, votre rigueur, votre regarde regard critique vis-à-vis de mes résultats et de mes présentations orales et vos conseils qui m'ont permise de passer cette thèse dans de bonnes conditions et d'acquérir de nouvelles connaissances dans des domaines divers. Je tiens également à les remercier pour leur patience lors de la rédaction et de la correction (de quelques fautes d'orthographe…) de ce manuscrit.

Je tiens à remercier tout particulièrement Martial Masson qui a su prendre le temps de me former à l'analyse de la démarche CatWalk. Merci d'être aussi passionné et un grand merci pour ce temps passé avec toi que ce soit au CatWalk, à l'analyse d'image ou à la machine à café.

Merci également à François-Xavier Lefèvre pour son aide et sa participation sur les analyses SAA, MEB et RMN du solide. Je n'oublierai pas ces journées et particulièrement celles à Orléans ainsi que cet excellent burger agrémenté de papier alu.

Merci à mes 2 fées Charlotte et Myriam pour tout ce que vous m'avez appris, vos conseils et surtout cette bonne humeur dans les laboratoires. Merci Charlotte d'avoir su trouver les mots durant cette 3ème année lorsque j'étais (un peu trop) perdue dans ma rédaction.

Mes remerciements s'adressent également à Pierre-Emmanuel Petit pour m'avoir formée à l'analyse DRX, à Sophie Quillard et Jean-Yves Mevellec pour ces journées d'analyses sur les cartographies Raman. Merci également à Stéphane Grolleau d'avoir pris le temps d'analyser mes échantillons.

Je tiens à remercier également Valérie Montouillout et Franck Fayon de m'avoir accueillie au CEMTHI, d'avoir pris le temps de me montrer et de réaliser toutes les analyses RMN du solide. Merci également de m'avoir permise de présenter mes travaux lors d'une journée CNRS.

Merci aux Dr Gilles Amador Del Valle et Jocelyne Caillon pour ces discussions très enrichissantes sur les effets antibactériens de mes composés. J'ai également beaucoup apprécié avoir pu réaliser ces expériences pour lesquelles je n'avais, à l'origine, aucune connaissance.

Je remercie également Guylène Hamery et les animaliers pour leur accueil et leurs conseils quant à la manipulation des animaux lors de cette étude CatWalk.

Merci à Massoud Fattahi-Vanani et Guillaume Blain d'avoir accepté de réaliser mon petit projet sur la stérilisation gamma et surtout un grand merci à eux mais également à Johan Vandenborre pour m'avoir soutenue lors de cette thèse.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe des laboratoires CEISAM et RMeS pour leur accueil, leur gentillesse et leurs bonnes humeurs. Merci à mes collègues : Florian, Yefa, Ilef, Thomas, Joanna, Marina, Antoine, Léa, Katy, Gilles et toutes les autres personnes qui ont su rendre cette thèse enrichissante et agréable, par leurs aides et leurs convivialités et qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ces 3 années.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tout mon entourage, ma famille et surtout à ma petite sœur, pour m'avoir soutenue (et supportée) tout au long de cette thèse.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE I : INGÉNIERIE OSSEUSE 5
1. Le tissu osseux 5
1.1. Structure et composition chimique de l'os 5
1.1.1. Structure 5
1.1.2. Composition chimique 7
1.2. Remodelage osseux 8
2. Les greffes et les substituts osseux 10
2.1. Les greffes 10
2.1.1. Autogreffe 10
2.1.2. Allogreffe 11
2.1.3. Xénogreffe 12
2.2. Les phosphates de calcium comme substituts osseux 12
2.2.1. La chimie des phosphates de calcium 12
2.2.2. Utilisation en céramiques 15
2.2.3. Utilisation en ciments 16
2.2.3.1. Ciment brushitique 17
2.2.3.2. Ciment apatitique 17
2.2.3.3. Propriétés des CPCs 18
2.3. Applications en chirurgie osseuse 23
2.3.1. Comblement osseux 23
2.3.2. Fusion et arthrodèse 24
2.3.3. Ancrage osseux 25
2.4. Les limites 25
3. Les dispositifs osseux combinés 26
3.1. Méthodes d'association 26
3.2. Modification des propriétés intrinsèques des CPCs 28
3.3. Cinétique de libération 29
3.4. Exemples de dispositifs combinés 31

CHAPITRE II : CIMENT APATITIQUE A VISÉE ANALGÉSIQUE POUR LA RECONSTRUCTION OSSEUSE 33
1. Physiologie de la douleur 33
1.1. Définition 33

1.2. Caractéristiques de la douleur 34
1.3. Spécificité de la douleur osseuse 35
1.4. Cas particulier de la douleur lors d'un prélèvement osseux de la crête iliaque 36
2. Gestion et prise en charge de la douleur osseuse 38
2.1. Analgésie multimodale 39
2.2. Anesthésiques locaux 40
2.2.1. Mécanisme d'action 40
2.2.2. Structure des anesthésiques locaux 42
2.2.3. Anesthésiques locaux d'intérêts 44
3. Systèmes combinés de libération d'anesthésiques locaux 46

Partie A : Formulation et caractérisations physico-*chimiques d'un ciment PCa chargé en* anesthésiques locaux 51
1. Formulation de CPCs combinés avec des anesthésiques locaux 51
1.1. Protocole expérimental 51
2. Étude des propriétés physico-chimiques de CPCs chargés en anesthésiques locaux 51
2.1. Matériels et Méthodes 51
2.1.1. Diffraction des rayons X sur poudre (pDRX) 51
2.1.2. Spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier 52
2.1.3. Résonance magnétique nucléaire du solide 52
2.1.4. Temps de prise 53
2.1.5. Propriétés d'extrusion 53
2.1.6. Résistance à la compression 54
2.1.7. Porosité 54
2.1.8. Microscopie électronique à balayage 55
2.2. Résultats 56
2.2.1. Nature du produit obtenu après prise 56
2.2.2. Influence des analgésiques sur les propriétés texturales du CPC 60
2.2.3. Influence des analgésiques sur la structure du biomatériau 62
3. Intégrité des principes actifs au sein du ciment 66
3.1. L'association nuit-elle à l'intégrité des principes actifs ? 66
3.2. La stérilisation gamma altère-t-elle les principes actifs ? 70
4. Études de la libération des anesthésiques in vitro 72
4.1. Protocole expérimental 72
4.2 Résultats et discussions 72
4.2.1. Courbes de libération de la bupivacaïne et de la ropivacaïne 72
4.2.2. Cinétique de libération : modèles mathématiques 73
4.2.3. Visualisation de la libération par cartographie raman 75

4.2.4. Cas de la levobupivacaïne 79
4.2.4.1. Influence de la granulométrie 80
4.2.4.2. Influence de la structure 83
5. Conclusions 92

Partie B *: Influence d'un* ciment PCa chargé en anesthésiques locaux sur la démarche postopératoire et la régénération osseuse 93
1. Présentation du contexte général 93
1.1. Choix d'un modèle animal 93
1.1.1. Description et réglementation 93
1.1.2. L'animal comme modèle de la douleur chez l'Homme 94
1.2. Évaluation de la douleur postopératoire in vivo 95
1.2.1. Méthode visuelle d'évaluation de la douleur 95
1.2.2. Méthodes reposant sur une mesure de sensibilité 98
1.2.3. Méthodes reposant sur la démarche 99
2. Création d'un défaut critique 102
2.1. Modèle animal 102
2.2. Modèle chirurgical 102
3. Analyse fonctionnelle de la démarche 104
3.1. Matériels et méthodes 104
3.1.1. Le système CatWalk : présentation 104
3.1.1.1. Principe de l'analyse CatWalk 104
3.1.1.2. Procédure analytique 106
3.1.1.3. Les paramètres 107
3.2. Résultats et discussions 111
3.2.1. Influence sur un membre opéré 111
3.2.2. Influence sur le parallélisme 116
3.2.3. Influence sur la coordination 120
3.2.4. Avantages et limites du système Catwalk 122
4. Propriétés de reconstruction osseuse 124
4.1. Matériels et méthodes 124
4.1.1. Préparation d'échantillon : fixation, déshydratation, imprégnation et inclusion 124
4.1.2. Microtomographie aux rayons X (µCT) 125
4.1.3. Microscopie électronique à balayage 125
4.1.4. Histologie et colorations 126
4.2. Résultats et discussions 127
4.2.1. Reconstruction 3D 127

4.2.2. Observations MEB des implants 128
4.2.3. Histologie 130
5. Propriétés antibactériennes 131
5.1. Protocole expérimental 132
5.1.1. Concentration minimale inihbitrice et bactéricide 132
5.1.2. Essai sur la libération de la bupivacaïne 133
5.2. Résultats et discussions 133
5.2.1. Détermination des CMI et CMB 133
5.2.2. Étude des activités inhibitrice et bactéricide d'un Bupi-CPC 134
6. Conclusions et perspectives 135

CHAPITRE III : CIMENT APATITIQUE GALLIÉ A VISÉE THÉRAPEUTIQUE 137
1. Pathologies osseuses 138
1.1. Ostéoporose 138
1.2. Tumeurs osseuses 139
2. Propriétés biologiques et applications thérapeutiques du gallium 140
2.1. Structures chimiques 141
2.2. Applications thérapeutiques 142
2.2.1. Le gallium pour l'imagerie médicale 142
2.2.2. Activités anti-inflammatoires et immunosuppressives 143
2.2.2. Activités antimicrobiennes 143
2.2.4. Activité antinéoplasique 144
2.2.5. Effet sur l'hypercalcémie d'origine maligne 144
3. Intégration de gallium au sein d'un biomatériau osseux 146
3.1. Le gallium et les ciments phosphocalciques 146
3.2. Le gallium et les céramiques phosphocalciques 147

Partie A : Synthèse et caractérisations physico-*chimiques d'un ciment PCa gallié* 149
1. Synthèse du maltolate de gallium 149
1.1. Dosage de la teneur en eau des réactifs de départ 149
1.2. Synthèse 150
1.3. Vérification de la pureté du GaM 150
2. Formulation du ciment chargé en maltolate de gallium 153
3. Étude des propriétés physico-chimiques de CPCs chargés en GaM 154
3.1. Influence du maltolate de gallium sur la réaction de prise et le produit final 155
3.2. Influence du maltolate de gallium sur les propriétés texturales du CPC 157
3.3. Influence du maltolate de gallium sur la structure du biomatériau 159
4. Intégrité du malolate de gallium au sein du ciment 161

5. Études de la libération du maltolate de gallium in vitro 166
4.1. Étude de la libération du gallium 166
4.2. Étude de la libération du maltolate de gallium 167
4.3. Visualisation de la libération par cartographie raman 171
6. Premières études in vitro 174
6.1. Protocole expérimental 175
6.1.1. Concentration minimale inhibitrice et bactéricide 175
6.1.2. Essai sur la libération du GaM 175
6.2. Résultats 175
6.2.1. Détermination des CMI et CMB 175
6.2.2. Étude des activités inhibitrice et bactéricide d'un CPC-7G 176
7. Conclusions et Perspectives 177

Partie B *: Essai d'une formulation d'un ciment PCa* chargé en caséine 179
1. Obtention de la caséine 181
2. Formulation du ciment 181
2.1. Validation d'un modèle de ciment combiné en caséine sans HPMC 181
2.1.1. Influence de la caséine sur la structure du biomatériau 182
2.1.2. Influence sur les propriétés texturales du biomatériau 184
2.2. Étude de l'impact de la caséine sur un CPC contenant de l'HPMC 186
2.2.1. Influence sur la réaction de prise et le produit final 186
2.2.2. Influence sur les propriétés texturales du CPC 189
2.2.3. Influence de la caséine sur la structure du biomatériau 191
3. Intégrité de la caséine au sein du ciment 194
3.1. Après association 194
3.2. Après irradiation gamma 195
3.2.1. Procédure analytique 195
3.2.1.1. Source γ 195
3.2.1.2. Dosimétrie liquide et solide 196
3.2.1.3. Spectrométrie de résonance paramagnétique électronique 198
3.2.1.4. Microchromatographie en phase gazeuse (µGC) 198
3.2.1.5. LC/MS 199
3.2.2. Résultats 199
3.2.2.1. Mise en place de la dosimétrie solide 199
3.2.2.2. RPE 201
3.2.2.3. µGC 201
3.2.2.4. LC/MS 202

4. Études de la libération de la caséine in vitro 203
5. Conclusions 204

Partie C : Formulation et caractérisations physico-chimiques de ciments PCa chargés en caséine et en maltolate de gallium 205
1. Formulation de CPCs combinés avec de la caséine et du maltolate de gallium 205
2. Étude des propriétés physico-chimiques du ciment chargé 205
2.1. Influence sur la réaction de prise et le produit final 205
2.2. Influence du maltolate de gallium sur les propriétés texturales du CPC 207
2.3. Influence du maltolate de gallium combiné à la caséine sur la structure du biomatériau 209
3. Morphologie du maltolate de gallium au sein du ciment 212
4. Études de la libération du maltolate de gallium in vitro 213
4.1. Étude de la libération du maltolate de gallium 213
4.2. Étude de la libération du ligand maltol 215
5. Conclusions et perspectives 217

CONCLUSION GÉNÉRALE 219

Références bibliographiques 225
Table des illustrations 245
Table des tableaux 253

Glossaire des acronymes

AG	Alginate
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
ANOVA	ANalysis Of VAriance (en), Analyse des variances
ATCC	American Type Culture Collection (en)
ASTM	American Society for Testing and Materials (en)
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy (en), Spectroscopie d'Absorption Atomique
ATCC	American Type Culture Collection (en)
ATCP	Phosphate TriCalcique Amorphe
α-TCP	α-TriCalcium Phosphate (en), α- Phosphate TriCalcique
ATG	Analyse ThermoGravimétrique
BCP	Biphasic Calcium Phosphate (en), Phosphate Calcique Biphasique
β-TCP	β-TriCalcium Phosphate (en), β- Phosphate TriCalcique
CD	Cyclodextrine
CDA	Calcium Deficient Apatite (en), Apatite Déficiente en Calcium
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPC	Ciment PhosphoCalcique
DCPA	DiCalcium Phosphate Anhydrous (en), Phosphate DiCalcique Anhydre (Monétite)
DCPD	DiCalcium Phosphate Dihydrate (en), Phosphate DiCalcique Dihydraté (Brushite)
DdD	Débit de Dose
DI	Double Intégrale
DMO	Densité Minérale Osseuse
DSC	Differential Scanning Calorimetry (en), Calorimétrie différentielle à balayage
EDX	Energie Dispersive de rayons X
ESI	ElectroSpay Ionization (en), Ionisation par Electronébuliseur
FDA	Food and Drug Administration (en)
GaM	Gallium maltolate (en), Maltolate de gallium
GQS	Graftys QuickSet
GMMA	Glycol Methyl MethAcrylate (en)
HA	HydroxyApatite
HAS	Haute Autorité de Santé
HE	Hématoxyline Eosine
HPMC	HydroxyPropylMéthyCellulose
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (en), Spectrométrie de masse haute résolution
IASP	International Association for the Study of Pain (en)
ITS	Intermediate Toe Spread (en), Écartement intermédiaire des orteils
IRTF	InfraRouge à Transformée de Fourier
LF	Left Front (en), Avant gauche
LH	Left Hind (en), Arrière gauche
MCPA	MonoCalcium Phosphate Anhydrous (en), Phosphate MonoCalcique Anhydre
MCPM	MonoCalcium Phosphate Monohydrate (en), Phosphate MonoCalcique Monohydraté

MEB	Microscopie Électronique à Balayage
µCT	Micro Computed Tomography (en), Microtomographie
µGC	Micro Gas Chromatography (en), Micro chromatographie en phase gazeuse
MH	Mueller-Hinton
MPL	Manual Print Length (en), Longueur d'empreinte manuelle
MS	Mass Spectrometry (en), Spectrométrie de Masse
NGF	Nerve Growth Factor (en), Facteur de croissance
NMDA	Acide N-méthyl-D-Aspartique (en)
OCP_a	apatitic OctaCalcium Phosphate (en), Phosphate OctoCalcique apatitique
OCP_{am}	amorphous OctaCalcium Phosphate (en), Phosphate OctoCalcique amorphe
OCP_t	triclinic OctaCalcium Phosphate (en), Phosphate OctoCalcique triclinique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONIRIS	Ecole nationale, vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes
OPG	OstéoProtéGérine
OXA	OxyApatite
PA	Principe Actif
PAr	Print Area (en), Surface de l'empreinte
PCa	Phosphate de Calcium
pDRX	Diffraction des Rayons X sur poudre
PE	PolyEthylène
pH	Potentiel Hydrogène
PIXE	Particle Induced X-ray Emission Spectrometry (en), Spectrométrie à Emission de photons X Induite par Particules
PL	Print Length (en), Longueur d'empreinte
PLGA	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) (en)
PMMA	Poly(Methyl MethAcrylate) (en)
PP	PolyPropylène
Pr	Protéine
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène
PW	Print Width (en), Largeur d'empreinte
RDI	Région D'Intérêt
RF	Right Front (en), Avant droite
RH	Right Hind (en), Arrière droite
RI	Regularity Index (en), Index de régularité
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography (en), chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator (en), Modulateur Sélectif des Récepteurs des Estrogènes
t_i	Temps de prise initial
TCD	Thermal Conductivity Detector (en), Détecteur à Thermos-Conduction
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy
t_f	Temps de prise final
TMS	Trimethylsilyle (en)
TTCP	TeTraCalcium Phosphate (en), Phosphate TéTraCalcique
UTE	Unité Thérapeutique Expérimentale
UV	UltraViolet
Vs	Versus

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies ostéo-articulaires concernent des millions de personnes et représentent un réel souci de santé publique.[1,2] La restauration d'une perte de substance osseuse, où le processus physiologique de remodelage osseux s'avère insuffisant, nécessite le recours à la chirurgie de reconstruction. En dépit des avantages des interventions chirurgicales telles que l'ostéosynthèse et la chirurgie peu invasive, il existe encore de nombreuses circonstances où la guérison peut s'avérer difficile. En raison de leur ostéogénicité, de leur ostéo-inductivité et de leur ostéoconductivité, les greffes osseuses autologues restent, de nos jours, la méthode de référence.[3] Cependant, certains cas démontrent clairement les avantages des substituts osseux synthétiques par rapport aux greffes osseuses.[4] En effet, les interventions chirurgicales sont longues au bloc opératoire, coûteuses en hospitalisation et induisent une morbidité telle que des douleurs chroniques. Cette procédure de prélèvement osseux nécessite également un second site opératoire pouvant entraîner des complications postopératoires.[5] De plus, la quantité d'os implantable s'avère restreinte. Ces limites, ainsi que l'augmentation de la demande, ont mené à l'essor de substituts osseux synthétiques à base de phosphates de calcium (PCa).

Le développement de ces substituts osseux a considérablement augmenté en raison de leur procédure de fabrication fiable et de leur capacité à être combinés avec des agents thérapeutiques et des cellules. Ces biomatériaux, dont la composition chimique est similaire à la phase minérale de l'os, sont biocompatibles et biorésorbables.[6–8] Ces avantages ainsi que les nouvelles approches thérapeutiques comme les techniques percutanées ou mini-invasives ont permis le développement de biomatériaux injectables à base de phosphate de calcium pour le remplacement osseux et, en particulier, les ciments phosphocalciques (CPCs). Ces derniers sont basés sur un mélange solide de phosphates de calcium qui, au contact d'une phase liquide, vont réagir ensemble afin de fournir une pâte qui durcira in situ après injection.[9] Cette réaction de prise qui n'est que très légèrement exothermique offre la possibilité d'y intégrer des molécules actives sans les dégrader.

Actuellement, les recherches visent (i) à améliorer les propriétés mécaniques et texturales des ciments phosphocalciques (ii) à apporter une réponse thérapeutique pour des contextes cliniques délicats comme les infections, les tumeurs ostéolytiques, la douleur osseuse, etc. L'association d'un CPC avec un principe actif (PA) permet une libération localisée pouvant aider à la stimulation de la formation osseuse et/ou au ciblage des pathologies [10,11]. En outre, la libération de PA directement in situ permet l'amélioration de leur biodisponibilité, de leur efficacité et de leur tolérance par rapport à un traitement par voie systémique.

Ce travail de thèse concerne le développement de ciments phosphocalciques combinés à des agents d'intérêt thérapeutique destinés aux comblements de défauts osseux après une chirurgie de reconstruction osseuse. Deux applications cliniques seront visées (i) la douleur postopératoire occasionnée lors du prélèvement d'un greffon osseux et (ii) les affections osseuses caractérisées par une hyperactivité ostéoclastique et pouvant être traitées par du gallium comme les tumeurs ostéolytiques.

La douleur postopératoire consécutive à la reconstruction osseuse est l'une des complications les plus fréquentes, en particulier dans les procédures d'autogreffe où le site donneur est la crête iliaque.[4,12–16] Cette douleur initialement aiguë peut devenir chronique et concerne jusqu'à 39 % des patients.[17] Il en résulte ainsi de multiples conséquences d'un point de vue thérapeutique, économique et social.[18] L'objectif de cette étude est de minimiser le risque de développer une douleur chronique. Il est donc nécessaire de prendre en charge la douleur pendant les quatre premiers jours postopératoires.[19] Le traitement conventionnel repose sur une association de thérapies non médicamenteuses (glaçage, immobilisation…) et médicamenteuses par voie systémique (paracétamol, morphine…). Néanmoins, il est connu que ces médicaments possèdent de nombreux effets secondaires, en particulier pour la morphine chez les personnes âgées, pouvant entraver la guérison et augmenter la durée d'hospitalisation. L'analgésie multimodale associe des médicaments analgésiques et des techniques ayant des sites d'action différents et complémentaires, augmentant ainsi les chances de limiter la douleur postopératoire.[20] En outre, elle augmente l'effet analgésique et réduit les effets secondaires.[21,22] C'est pourquoi, nous proposons de développer des ciments phosphocalciques injectables chargés d'anesthésiques locaux pouvant être intégrés dans une approche d'analgésie multimodale.

Dans l'organisme, la douleur a un rôle de signal d'alarme lié à des lésions tissulaires. Les douleurs osseuses peuvent provenir d'une origine traumatique, comme les fractures, ou pathologique comme les tumeurs osseuses. Néanmoins, la douleur n'est pas la seule conséquence de ces affections. La perte de substance osseuse issue d'un déséquilibre du remodelage osseux est également à considérer. Le potentiel thérapeutique du gallium sur les affections osseuses a conduit à concevoir des biomatériaux chargés en gallium et à étudier leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.[23,24] Ainsi, il a été démontré que la libération du gallium d'une céramique phosphocalcique génère des effets bénéfiques sur la repousse osseuse.[24] Ce travail a également démontré un potentiel antitumoral du gallium. Ainsi ce

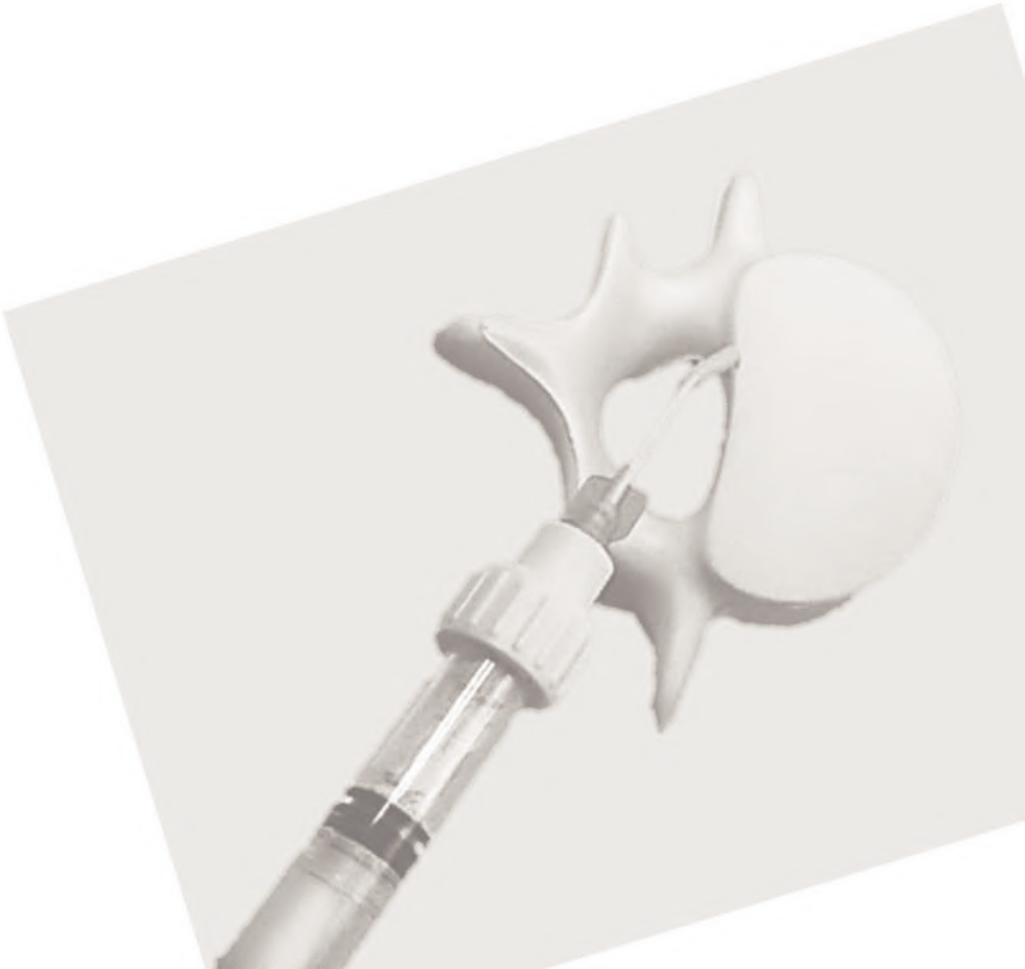
biomatériau pourrait, lors d'une résection tumorale (i) inhiber la prolifération et l'activité des cellules cancéreuses restantes sur le site (ii) avoir un effet bénéfique sur l'hypercalcémie et (iii) promouvoir la reconstruction osseuse. Des précédents travaux de notre équipe ont déjà porté sur l'intégration de gallium au sein d'un ciment phosphocalcique.[23] Cependant, la quantité intégrée étant trop faible, les études in vivo n'ont pas permis de discriminer le ciment chargé en gallium du ciment contrôle non chargé. L'objectif de ce travail serait donc d'intégrer, en quantité suffisante, du gallium dans un ciment phosphocalcique et de moduler sa libération dans un milieu physiologique.

Le premier chapitre de ce travail consacré à l'ingénierie osseuse inclura les généralités sur le tissu osseux, les différents substituts osseux utilisés dans le cadre de pertes osseuses et les dispositifs combinés intégrant des agents thérapeutiques.

Le deuxième chapitre sera destiné à l'élaboration de ciments phosphocalciques associés à des anesthésiques locaux (la bupivacaïne, la levobupivacaïne et la ropivacaïne). Il débutera par un état de l'art sur la problématique de la douleur osseuse après une chirurgie de reconstruction osseuse et notamment après le prélèvement d'un greffon iliaque. Ce chapitre sera divisé en deux parties. Une première partie sera destinée à la formulation et aux caractérisations physico-chimiques de ces ciments et la seconde partie étudiera l'influence de ces biomatériaux chargés en anesthésiques locaux sur l'analyse de la démarche et la régénération osseuse sur un modèle (rat) de douleur postopératoire. C'est ici la première fois que le système CatWalk sera utilisé pour l'évaluation fonctionnelle du soulagement de la douleur lié à l'injection d'un CPC chargé en analgésiques.

Pour finir, le troisième chapitre sera dédié à l'élaboration d'un ciment associé à un complexe de gallium, le maltolate de gallium, utilisable comme substitut osseux dans des pathologies telles que l'ostéoporose et les tumeurs ostéolytiques provoquant un déséquilibre du remodelage osseux. Ce chapitre sera divisé en trois parties. La première partie décrira la synthèse relative au maltolate de gallium ainsi que son incorporation au sein du ciment phosphocalcique. Les caractérisations physico-chimiques seront alors étudiées. Désirant induire des modifications sur la cinétique de libération du composé, une protéine, la caséine, sera introduite dans la phase solide du biomatériau. Par conséquent, la faisabilité de cette association sera étudiée dans une deuxième partie. La dernière partie sera consacrée à la formulation du ciment combiné avec le maltolate de gallium et la caséine. Cette étude portera notamment sur la modification de la cinétique de libération du principe actif en fonction de la concentration en caséine.

CHAPITRE I : INGÉNIERIE OSSEUSE



1. Le tissu osseux

1.1. Structure et composition chimique de l'os

L'os assure plusieurs types de fonctions : (i) un rôle mécanique (ii) un rôle de réservoir à minéraux et (iii) un rôle métabolique. Charpente du corps humain, les os permettent ainsi de protéger les organes internes[25] et, en conjonction avec les muscles, génèrent la capacité à se mouvoir. Ce tissu, à la fois solide et résistant, est aussi dans une certaine mesure, élastique, et permet d'assurer un rôle biomécanique. En effet, ce dernier lui permet de supporter des sollicitations mécaniques de type compression, torsion, cisaillement, traction ou choc. De plus, ce tissu dynamique en perpétuel renouvellement permet la libération et le stockage de sels minéraux entraînant ainsi le maintien de l'équilibre phosphocalcique. Pour finir, l'os assure une fonction hématopoïétique, c'est-à-dire que la moelle osseuse, située en son cœur, contient des cellules hématopoïétiques qui permettent la formation des cellules sanguines (hématies, polynucléaires, plaquettes).

1.1.1. Structure

Le corps humain adulte est composé de 206 os dont la taille et la forme diffèrent selon leur fonction et de leur localisation dans le squelette. Il existe différentes catégories d'os : les os longs (comme le fémur ou l'humérus), les os plats (comme l'omoplate) et les os courts (comme la patella). Suivant le type d'os considéré, il est possible de distinguer deux catégories d'architecture osseuse[26] : l'os cortical et l'os spongieux (ou trabéculaire).

L'os cortical représente 80 % des surfaces osseuses. Il est composé de fibres de collagène disposées en lamelles superposées parallèlement les unes aux autres (Figure 1). Organisées de manière concentrique autour du canal de Havers, ces dernières forment les ostéons (également appelés système de Havers). Cette unité structurale permet le passage des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Cette disposition confère à l'os cortical sa résistance mécanique (voir infra, pages 22 - 23) qui dépend également de paramètres extrinsèques (direction et vitesse d'applications des contraintes) ou intrinsèques (géométrie de la pièce osseuse). Ce type d'os constitue la paroi externe de toutes les pièces osseuses ainsi que la diaphyse des os longs (Figure 2).

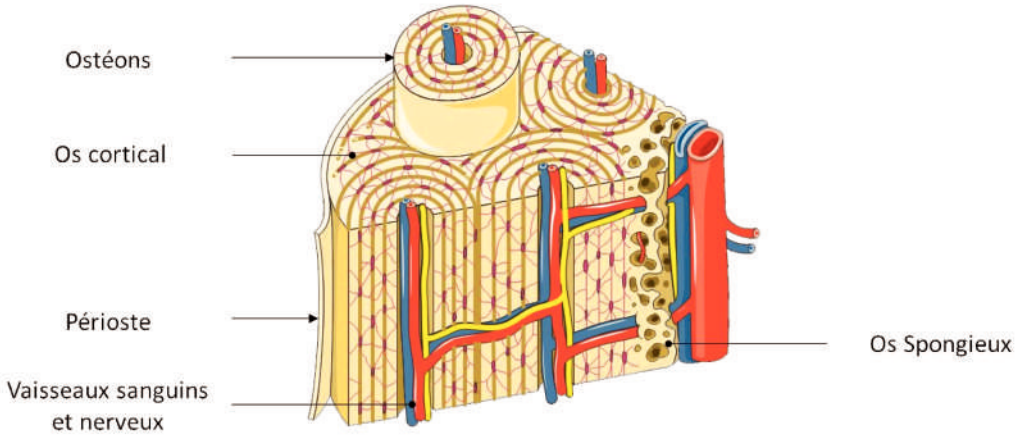


Figure 1 *: Structure d'un os*

L'os spongieux représente 20 % du squelette adulte. Il est organisé en trabécules de tissu osseux, ramifiés et anastomosés, permettant ainsi l'interconnexion d'espaces occupés par la moelle osseuse et les vaisseaux. Cette structure dense et extrêmement poreuse (taille des pores allant de 200 à 400 µm) lui confère des propriétés fonctionnelles (capacités d'échanges considérables avec les liquides interstitiels : rôle majeur dans l'équilibre phosphocalcique), et structurelles (renouvellement rapide, amortissement lors de compression mécanique grâce à la moelle osseuse emprisonnée à l'intérieur).[27] Ce type d'os constitue l'épiphyse des os longs et l'intérieur des os plats (Figure 2).

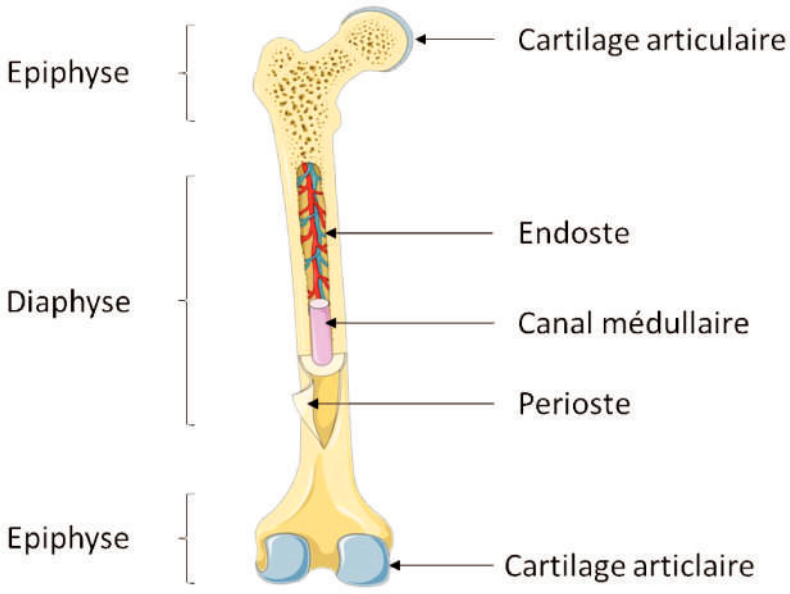


Figure 2 *: Anatomie d'un os long*

1.1.2. Composition chimique

Le tissu osseux qu'il soit cortical ou spongieux est un tissu conjonctif squelettique hautement spécialisé caractérisé par sa matrice extracellulaire. Cette dernière comprend une phase organique (22 %) principalement constituée de collagène de type I (90 %), une phase inorganique (69 %) et de l'eau dont la quantité est variable selon l'âge et le degré de minéralisation.

La phase minérale dont la structure et la composition sont proches de l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ notée HA, a été tout d'abord identifiée comme étant un phosphate de calcium apatitique poly-substitué,[28] dont la formule est présentée ci-dessous :

$$Ca_{8,3}\square_{1,7}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_{1,0}(HPO_4)_{0,7}(OH)_{0,3}\square_{1,7}$$

Où les lacunes sont notées □ et représentent la non-stœchiométrie de l'apatite biologique.
Cette formule a été ajustée quelques années plus tard, grâce à l'étude de la localisation des ions carbonates par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) :[29]

$$Ca_{8,3}\square_{1,7}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_{1,0}(HPO_4)_{0,7}(CO_3,OH)_{0,3}\square_{1,7}$$

Cette formule n'est cependant qu'une représentation globale de la composition chimique de la phase minérale osseuse puisque cette dernière varie selon le type de tissu osseux (cortical vs spongieux) et évolue en fonction du temps, de l'espèce et du sexe.[30]

La surface de cette apatite biologique possède une très grande réactivité vis-à-vis du milieu biologique, due à la présence d'une couche hydratée majoritairement composée d'ions bivalents tels que HPO_4^{2-}, Ca^{2+} et CO_3^{2-} (Figure 3). Ces espèces mobiles sont facilement échangées de manière réversible par les ions provenant des fluides biologiques environnants ou par des protéines (Pr).[31]

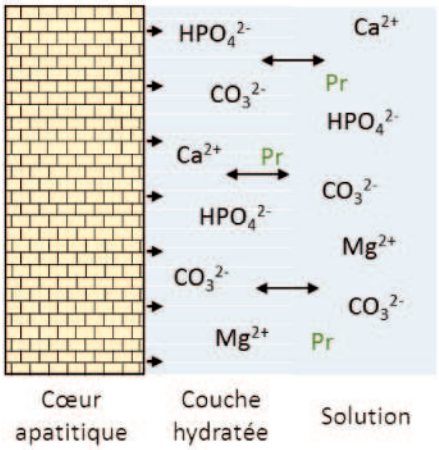


Figure 3 : *Représentation des échanges entre la surface d'une apatite et le milieu biologique*[31]

1.2. Remodelage osseux

L'os est une matière vivante qui, tout au long de la vie, se renouvelle grâce à une activité métabolique importante des cellules osseuses. Ce processus, appelé remodelage osseux, permet la régénération totale du squelette d'un adulte sain tous les 10 ans et préserve ainsi les propriétés biomécaniques de l'os. Ce renouvellement physiologique s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage qui associent les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse et les ostéoblastes responsables de la formation de la matrice osseuse.

Ce phénomène se déroule selon les quatre phases suivantes (Figure 4) :

- La phase d'activation,

  Les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse vont s'activer et attirer les pré-ostéoclastes vers cette surface par chimiotactisme,
- La phase de résorption,

  Les pré-ostéoclastes vont fusionner pour devenir des ostéoclastes matures et adhérer à la surface osseuse. Ces nouvelles cellules vont migrer le long de la surface en formant des lacunes de résorption créées par la dissolution de la phase minérale du tissu osseux,
- La phase d'inversion,

  Les ostéoclastes vont mourir par apoptose et être remplacés par des macrophages qui vont lisser le fond de la lacune,
- La phase de formation osseuse.

  Cette étape intervient après le recrutement et la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes. Ces derniers vont combler la lacune en apposant une nouvelle matrice organique (le tissu ostéoide) qui sera par la suite minéralisée. Pour finir, les ostéoblastes vont devenir quiescents et border le nouveau tissu formé.

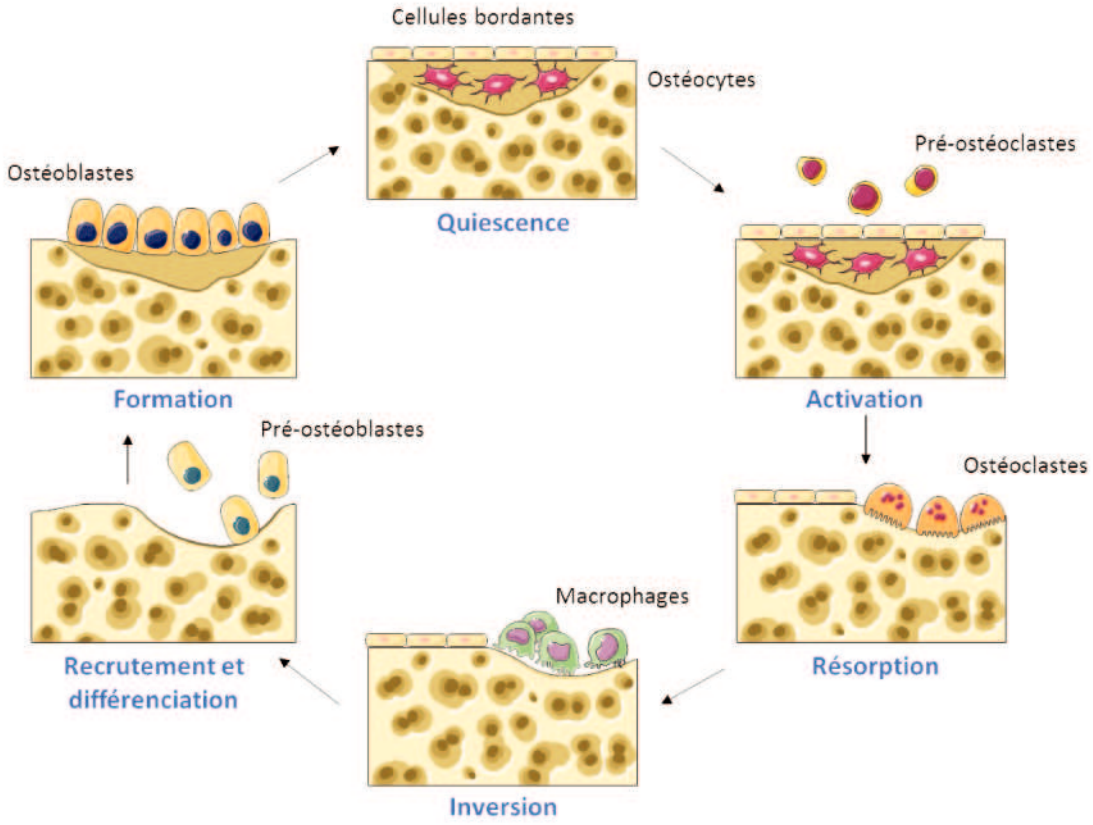


Figure 4 : Cycle du remodelage osseux. Figure adaptée[32]

Ainsi, ce mécanisme de renouvellement osseux confère, pour un adulte sain, une capacité d'auto-cicatrisation. De ce fait, suite à une perte minime de tissu osseux, ce dernier à la possibilité de se réparer. Cependant, l'efficacité de cette propriété diminue au cours du vieillissement, entraînant une réduction de la masse osseuse liée à l'âge mais aussi au mode de vie ou à des facteurs héréditaires.

La perte de substance osseuse peut résulter soit (i) de causes pathologiques provenant d'un remodelage osseux anormal aboutissant à une détérioration de la microarchitecture du tissu osseux (comme dans le cas d'ostéoporose ou d'un cancer osseux) soit (ii) d'une cause traumatique (telle qu'une fracture). Ces types de défauts osseux sont illustrés sur la Figure 5 ci-après.

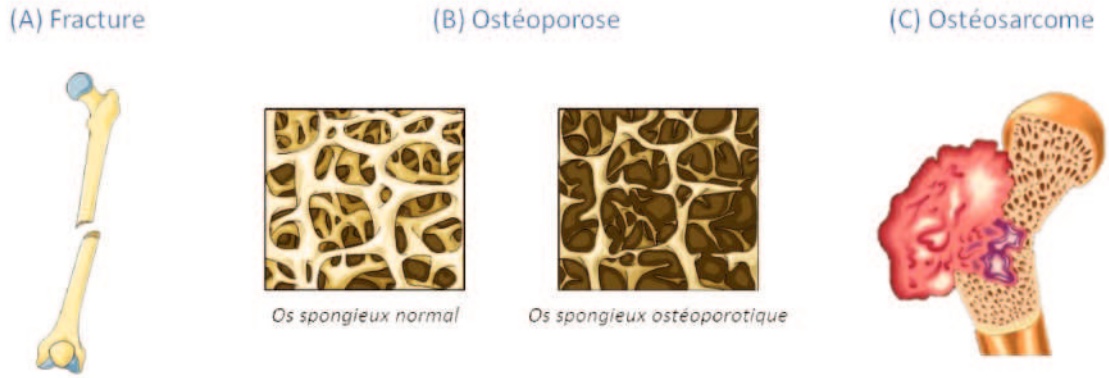


Figure 5 : Déficiences osseuses : causes traumatiques (A) fracture ou causes pathologiques (B) ostéoporose, (C) ostéosarcome

Suite à une perte de substance osseuse où le processus de remodelage osseux s'avère insuffisant, il est alors nécessaire de recourir à la chirurgie de reconstruction osseuse.

2. Les greffes et les substituts osseux

2.1. Les greffes

2.1.1. Autogreffe

L'autogreffe reste de nos jours considérée comme la méthode de référence du remplacement osseux.[3] Cette technique consiste à prélever le greffon osseux sur le patient lui-même, sur un os qui a une capacité de se reconstruire facilement (comme le péroné) ou sur une région sur laquelle le déficit osseux n'induira pas de désagréments majeurs (comme la crête iliaque ou la mandibule).[33] Le greffon est ensuite implanté dans le site d'intérêt fragilisé. Cette technique a l'avantage d'apporter un tissu ayant des caractéristiques cellulaires similaires au site d'implantation, assurant ainsi une compatibilité optimale sur celui-ci, et permettant d'éviter le risque de rejet. De plus, ce type de greffon est le seul à présenter une capacité ostéogénique (Tableau 1), c'est-à-dire qu'il contient des cellules capables de se différencier en ostéoblastes, ce qui augmente significativement son intégration et le remodelage osseux dans le site de transfert. Il présente également les capacités d'ostéoconduction, propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, et d'ostéoinduction, c'est-à-dire, la capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable.[1]

Cependant, il existe plusieurs inconvénients à cette greffe tels que la quantité d'os implantables qui reste souvent limitée (20 cm^3) ainsi que la nécessité d'un second site opératoire pouvant entraîner des complications postopératoires dont de fortes douleurs.[5]

2.1.2. Allogreffe

Lorsque l'autogreffe s'avère inenvisageable pour des raisons d'âge, d'état de santé général du patient ou bien de la localisation de la lésion, le chirurgien peut avoir recourt à un autre type de greffe : l'allogreffe. Cette méthode consiste en l'implantation d'un greffon issu d'un donneur de la même espèce biologique du receveur. Ce greffon peut venir de différentes origines :[34] d'un donneur vivant ayant subi une arthroplastie de hanche, d'un donneur d'organe ou encore d'un prélèvement post-mortem. L'avantage de cette procédure réside dans la possibilité de préserver les greffons par l'intermédiaire d'une banque de tissus. L'intégrité de ces tissus est alors garantie selon diverses méthodes telles que la congélation, la cryopréservation, ou la lyophilisation (Tableau 1).[35] Pour finir, cette opération ne nécessite pas de second site opératoire.

Tableau 1 : Résumé des propriétés des greffons[1]

Greffe	Type d'os	Préparation d'échantillon	Résistance mécanique	Ostéo-genèse	Ostéo-conduction	Ostéo-induction
Autogreffe	Spongieux	/	0	+++	+++	+++
	Cortical	/	+++	++	++	++
Allogreffe	Spongieux	Congelé	0	0	++	+
		Lyophilisé	0	0	++	+
	Cortical	Congelé	+++	0	+	0
		Lyophilisé	+	0	+	0

Les inconvénients liés à l'allogreffe sont la possibilité de rejet du greffon implanté[36] et la transmission d'agents pathogènes. Les méthodes de stérilisation mises en place dans le cas de greffe osseuse sont la stérilisation par rayonnement gamma et la stérilisation à l'oxyde d'éthylène. Cependant, cette dernière est à l'heure actuelle controversée en raison de son potentiel carcinogène. La stérilisation gamma, elle, modifie les propriétés physico-chimiques et mécaniques du greffon à partir d'une dose de 60 kGy,[37] ce procédé est alors réalisé de manière moins agressive et élimine ainsi les agents pathogènes les plus sensibles et de nombreux virus et bactéries. La dose reçue par l'échantillon doit être comprise entre 25 kGy et 60 Gky afin d'allier la préservation des propriétés mécaniques et l'élimination adéquate du risque pathogène. Néanmoins, les virus du SIDA, de l'hépatite B et de l'hépatite C ne sont pas convenablement éliminés.[38,39] Par exemple, pour le VIH une dose de 10 à 40 kGy est nécessaire afin d'obtenir une inactivation du virus et une dose de 89 kGy, pour assurer un niveau de stérilité acceptable.[40]

2.1.3. Xénogreffe

La xénogreffe peut également être proposée comme une alternative. Cette méthode consiste en l'implantation d'un tissu provenant d'une espèce différente du receveur. Par exemple, les produits commercialisés sont souvent d'origine bovine ou corallienne. Afin d'éviter un quelconque risque biologique, le greffon est soumis à des traitements chimiques, thermiques ou physiques. Néanmoins, à l'image des allogreffes, les techniques de stérilisation modifient les propriétés biologiques du tissu osseux. De plus, le risque de transmission est faible mais reste non négligeable.[41]

2.2. Les phosphates de calcium comme substituts osseux

En dépit des avantages des chirurgies mini-invasives utilisées en reconstruction osseuse, il existe encore de nombreuses circonstances où la guérison osseuse peut s'avérer difficile. En médecine, certains cas démontrent clairement les avantages des substituts osseux synthétiques par rapport aux greffes. À l'origine, utilisés comme support pour rétablir la fonction mécanique des os grâce à des matériaux inertes tel que des métaux (acier inoxydable) ou des composites, les substituts osseux présentent un fort intérêt pour la réparation tissulaire. Grâce à leur processus de fabrication fiable, reproductible et en quantité quasiment illimitée, le développement de biomatériaux synthétiques de substitution osseuse s'est considérablement étendu au cours des 15 dernières années. De plus, la possibilité de les combiner avec des agents thérapeutiques et des cellules les rendent d'autant plus attractifs pour l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Dans ce contexte, les phosphates de calcium, de par leur analogie avec la phase minérale osseuse, occupent une place privilégiée.

2.2.1. La chimie des phosphates de calcium

La famille des phosphates de calcium comporte de nombreux composés qui résultent de la neutralisation des différentes acidités de l'acide orthophosphorique H_3PO_4, dont les équations acido-basiques sont présentées ci-dessous :[42]

$$H_3PO_4(s) + H_2O(l) = H_2PO_4^-(aq) + H_3O^+(aq) \qquad pK_{a1} = 2,23$$

$$H_2PO_4^-(aq) + H_2O(l) = HPO_4^{2-}(aq) + H_3O^+(aq) \qquad pK_{a2} = 7,16$$

$$HPO_4^{2-}(aq) + H_2O(l) = PO_4^{3-}(aq) + H_3O^+(aq) \qquad pK_{a3} = 12,18$$

Les phosphates de calcium possèdent des propriétés physico-chimiques, des compositions chimiques et des structures cristallographiques variées. Ces composés, dont les rapports calcium/phosphore (notés Ca/P) varient entre 0,5 et 2 sont regroupés dans le Tableau 2.

Les orthophosphates de calcium peuvent être obtenus selon deux grandes voies d'élaboration.[43] Généralement, les composés ayant un rapport Ca/P < 1,67 sont préparés en solution à basse température (MCPM, MCPA, DCPD, DCPA, ATCP, OCP) et ceux dont le rapport Ca/P est supérieur à 1,67 sont synthétisés par voie solide à haute température (TTCP, OXA). Bien que les différentes formes du TCP aient un rapport Ca/P < 1,67, elles sont néanmoins obtenues par traitement thermique. L'hydroxyapatite stœchiométrique de rapport Ca/P=1,67 peut être synthétisée soit en solution à basse température soit par traitement thermique. Néanmoins, quelle que soit la nature du phosphate de calcium obtenue, celle-ci dépend de la méthode et donc des conditions de synthèse. Pour les PCa issus de la synthèse en solution, les facteurs influençant la nature chimique sont le rapport Ca/P, le pH et la température.[44] Pour les composés provenant de la fabrication à haute température, ce sont la température et le rapport Ca/P qui seront les paramètres déterminants de la synthèse.

Du fait de leur composition chimique proche de la phase minérale osseuse, les phosphates de calcium sont utilisés à part entière comme substituts osseux. Leurs fonctions principales sont de restaurer une résistance mécanique optimale au sein de l'os endommagé ainsi que de soutenir le remodelage osseux grâce à ses propriétés biologiques. De ce fait, la solubilité dans l'eau des orthophosphates de calcium (Tableau 2) se révèle être une des propriétés les plus importantes. Selon la littérature, l'ordre de solubilité des différentes phases est le suivant : MCPM > TTCP ≈ α-TCP > DCPD > DCPA > OCP > β-TCP > CDA > HA [43]. Cet ordre n'est donné qu'à titre indicatif puisqu'il est possible d'observer des valeurs expérimentales différentes.[45] De manière générale, cette propriété augmente lorsque le rapport Ca/P diminue (valable de 0,5 à 1,67). Cependant, certains PCa comme l'α-TCP et le β-TCP, ayant le même rapport Ca/P, possèdent des solubilités différentes. Il en est de même pour la fluoroapatite et l'hydroxyapatite (Ca/P = 1,67), qui possède une structure cristallographique similaire mais une composition chimique différente.

Tableau 2 : Principaux phosphates de calcium utilisés comme substituts osseux[43,44,46]

Nom	Acronyme	Formule chimique	Ca/P	Solubilité à 25°C, -log Ks	Utilisations
Phosphate monocalcique anhydre	MCPA	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	1,14	Ciment
Phosphate monocalcique monohydraté	MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2,H_2O$	0,5	1,14	Ciment
Phosphate dicalcique anhydre *Monétite*	DCPA	$CaHPO_4$	1	6,90	Ciment, dépôts, composites
Phosphate dicalcique dihydraté *Brushite*	DCPD	$CaHPO_4,2H_2O$	1	6,59	Ciment, dépôts, composites
Phosphate octocalcique triclinique	OCPt	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2,5H_2O$	1,33	96,6	Ciment
Phosphate octocalcique apatitique	OCPa	$Ca_8(PO_4)_{3,5}(HPO_4)_{2,5}(OH)_{0,5}$	1,33	96,6	Ciment
Phosphate octocalcique amorphe	OCPam	$Ca_8(PO_4)_4(HPO_4)_2,nH_2O$	1,33	96,6	Ciment
Phosphate tricalcique amorphe	ATCP	$Ca_9(PO_4)_{6,}nH_2O$	1,5	25,5	Ciment, dépôts, composites
Phosphate tricalcique α	α-TCP	$\alpha\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	1,5	25,5	Ciments, biocéramiques résorbables, composites
Phosphate tricalcique β	β-TCP	$\beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2$	1,5	28,9	Ciments, biocéramiques résorbables, composites
Apatite déficiente en calcium	CDA	$Ca_{10\text{-}x[]x}(PO_4)_{6\text{-}y}(HPO_4)_y(OH)_{2\text{-}z}$	1,5-1,67	85	Ciment
Hydroxyapatite	HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	116,8	Ciments, dépôts, céramiques, composites
Phosphate tétracalcique	TTCP	$Ca_4(PO_4)_2O$	2	38-44	Ciments

Les avantages des phosphates de calcium résultent de leurs propriétés biologiques. En effet, ils possèdent la capacité de s'intégrer parfaitement dans le tissu osseux sans aucune réaction inflammatoire délétère (propriété d'ostéointégration) ainsi que des propriétés d'ostéoconduction. Ces composés peuvent être proposés sous diverses formes[47] (revêtements de métaux, céramiques, composites ou ciments) et sont utilisés comme substituts biorésorbables, c'est-à-dire, qu'ils seront progressivement remplacés par de l'os néoformé.

En pratique, les orthophosphates de calcium les plus couramment utilisés tant dans l'élaboration de biomatériaux à basse température (ciment) qu'à haute température (céramique) sont les TCP et l'apatite. En revanche, pour l'ensemble des orthophosphates de calcium obtenus par précipitation en solution, leur décomposition à température modérée ne leur permet pas d'être utilisés sous forme céramique, qui nécessite un traitement à haute température. Néanmoins, en raison de leur réactivité en solution, ils entrent facilement dans la composition des ciments hydrauliques.

2.2.2. Utilisation en céramiques

Ces composés sont généralement obtenus après une mise en forme par frittage à température élevée (de l'ordre 1100 à 1300 °C). La majorité des poudres de PCa stables à haute température est utilisée sous forme céramique. Le but de cette mise en forme permet d'obtenir deux types de porosité : la microporosité et la macroporosité.
La microporosité correspond aux pores existants entre les cristaux dont la taille est de l'ordre de 10 µm. Ce paramètre est essentiel pour la bioactivité du matériau car il permet la circulation des fluides biologiques au sein de la matrice.
La macroporosité correspond aux pores induits par l'action de porogènes intégrés au préalable dans la phase solide de départ. Les pores sont qualifiés de macropores lorsque leur taille dépasse les 100 µm. Ces derniers sont essentiels au remodelage osseux car ils permettent la colonisation cellulaire et l'invasion vasculaire[48] mais compromettent les propriétés mécaniques,[48,49] excluant l'utilisation des céramiques dans des sites d'implantations nécessitant un soutien mécanique élevé.

Les phosphates de calcium les plus communément utilisés sont l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β. L'HA, grâce à sa structure proche de la phase minérale de l'os, peut être utilisée sous forme pure comme céramique non biorésorbable ou en combinaison. Les céramiques dites

biphasiques (BCP) sont constituées d'un mélange d'HA et de β-TCP et allient une bonne solubilité grâce au β-TCP et une bonne réactivité cellulaire grâce à l'HA.

Il est possible de retrouver les céramiques sous différentes formes telles que des granules, des blocs, des suspensions injectables ou encore utilisées comme revêtement de prothèse orthopédique.[47]

2.2.3. Utilisation en ciments

De nos jours, l'utilisation des phosphates de calcium sous forme céramique est fréquemment remplacée par une autre forme, celle des ciments. Découverts dans les années 1980 par Brown et Chow[7] et par LeGeros et al.[6], les ciments phosphocalciques se sont considérablement développés en tant que substituts osseux pour la reconstruction osseuse autant en chirurgie orthopédique qu'en chirurgie maxillo-faciale et dentaire.[50,51] Ces biomatériaux permettent à la fois le comblement et le renforcement osseux et peuvent être utilisés sous forme de pâte directement moulée dans le site osseux déficitaire ou bien sous forme injectable via une canule.

Les ciments phosphocalciques sont constitués de deux composantes, l'une solide correspond à un mélange de phosphate de calcium et l'autre, représentée par une phase liquide (eau pure, solution acide, basique ou tamponnée), joue le rôle de durcisseur. Ces deux composantes vont être mélangées avec un ratio liquide sur poudre (noté L/P) spécifique dans le but d'obtenir une pâte homogène. À l'issue de ce temps de gâchage, la pâte va durcir dans un temps donné jusqu'à devenir solide.[52] Ce durcissement est dû à une réaction de prise qui correspond à des phénomènes de dissolution et de précipitation. Durant la première phase, les solubilités relatives des différents phosphates de calcium présents vont entrer en jeu permettant la dissolution de la surface des réactifs de départ. Ces derniers vont alors, libérer des ions calcium et phosphate jusqu'à la sursaturation de la solution. Il s'ensuit, la précipitation d'un phosphate de calcium moins soluble. Les cristaux, issus de ce dernier phénomène, grossissent au fur et à mesure de la prise jusqu'à s'enchevêtrer,[53] ce qui va induire les propriétés mécaniques intrinsèques du ciment.

En dépit d'un grand nombre de formulations possibles, les CPCs développés jusqu'à présent sont les ciments brushitiques et les ciments apatitiques, caractérisés selon le produit obtenu après prise soit la brushite soit l'apatite respectivement. L'avantage de ces produits est leur

domaine de stabilité puisque l'apatite est le produit le plus stable à pH > 4,2 alors que la brushite est le plus stable à pH < 4,2.

2.2.3.1. Ciment brushitique

Les ciments brushitiques sont obtenus à partir d'une réaction acido-basique. En effet, le DCPD ne pouvant précipiter qu'à un pH inférieur à 6, il est important que la préparation de la pâte de ciment soit réalisée dans des conditions acides. Différentes formulations ont donc été proposées, la plupart contenant du phosphate tricalcique β comme le mélange proposé par Lemaitre et al.[54] de β-TCP et MCPM, pour lequel la réaction de prise est la suivante :

$$\beta - Ca_3(PO_4)_2 + Ca(H_2PO_4)_2.H_2O + 7H_2O \rightarrow 4CaHPO_4.2H_2O$$

Le MCPM peut également être remplacé par de l'acide phosphorique H_3PO_4 qui permet d'avoir un pH plus bas durant la réaction de prise.[55] Ce réactif, par rapport au MCPM, facilite la préparation du ciment, le contrôle de la composition chimique, et permet au matériau d'acquérir une résistance mécanique plus élevée. Cependant, son acidité peut entraîner lors de l'implantation des réactions inflammatoires et donc nuire à l'ostéointégration du ciment.[56,57] Le β-TCP peut-être substitué, lui par de l'α-TCP,[58] de la CDA[59] ou de l'HA. Ces mélanges permettent de moduler le temps de réaction de prise (de quelques secondes à quelques minutes). Le choix du phosphate de calcium va se faire en fonction de sa solubilité (moins il est soluble et plus les temps de prise sont longs). L'ajout d'additifs inhibant la croissance des cristaux peut aussi permettre de contrôler ces temps de prise.[60]

Le ciment brushitique possède une capacité à se dégrader extrêmement rapidement comparé aux ciments apatitiques.[56] Cette propriété provient de la meilleure solubilité du DCPD vis-à-vis de l'apatite déficiente en calcium (CDA). Cependant in vivo, cette dissolution générée par les fluides biologiques peut engendrer une insuffisance mécanique au niveau du site d'implantation ainsi que la formation d'os immatures.

2.2.3.2. Ciment apatitique

Les ciments apatitiques sont composés, à l'issue de la réaction de prise, de CDA. De ce fait, ces ciments ont une composition et une structure proche de l'apatite biologique. Il est possible de distinguer deux types de réaction[10,43] conduisant à cette phase minérale, (i) une réaction

d'hydrolyse faisant intervenir un CPC monocomposant à base d'α-TCP (équation ci-dessous) et (ii) une réaction acido-basique utilisant un CPC multicomposant.

$$3\,\alpha - Ca_3(PO_4)_2 + H_2O \rightarrow Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$$

La réaction d'hydrolyse de l'α-TCP en CDA est une réaction stœchiométrique où le rapport Ca/P ne varie pas. À l'inverse, dans les réactions mettant en jeu plusieurs composés, le rapport Ca/P de l'apatite finale dépend des composants initiaux. Par exemple, le ciment de Brown et Chow fait intervenir du TTCP (basique) et du DCPA (légèrement acide) afin de former de l'HA selon la réaction acido-basique suivante :

$$2Ca_4(PO_4)_2O + 2CaHPO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$$

Contrairement aux ciments bushitiques, les ciments apatitiques possèdent un temps de prise beaucoup plus lent. Ceci est dû à la cinétique de dissolution-précipitation qui peut être modulée grâce à (i) l'ajout d'additifs dans la solution de durcisseur tels que l'acide citrique, l'acide phosphorique, Na_2HPO_4 (la présence d'ions phosphate ou calcium provoque une sursaturation du milieu plus rapide et donc une réaction de prise plus rapide)[61] (ii) la taille des grains de phosphate de calcium (plus la granulométrie est fine et plus la surface de réactivité est grande)[62] (iii) la variation du ratio L/P (plus il est faible et plus la prise est rapide) et (iv) l'ajout de germe de cristallisation tels que l'HA et la CDA (qui accélère la cinétique en supprimant l'étape de germination).[52]

Les ciments apatitiques possèdent une solubilité relativement proche de celle de l'os. Ils sont donc très peu solubles en milieu neutre, ce qui leur permet de s'intégrer facilement dans le cycle du remodelage osseux.

2.2.3.3. Propriétés des CPCs

Les principaux avantages des CPCs proviennent de leur réaction de prise à la température basale usuelle du corps humain qui est de 37 °C et à leur capacité à durcir in vivo. De plus, ce sont des matériaux biocompatibles, résorbables avec d'excellentes capacités d'ostéoconduction.
Les CPCs se caractérisent selon les propriétés suivantes (Figure 6) :

- Les temps de prise,
- L'injectabilité,
- La cohésion,
- La porosité,
- Les propriétés mécaniques.

Ces propriétés varient en fonction de la composition et de la granulométrie de la phase solide, de la nature de la phase liquide, du ratio L/P et des conditions opératoires (température, hygrométrie, etc.).

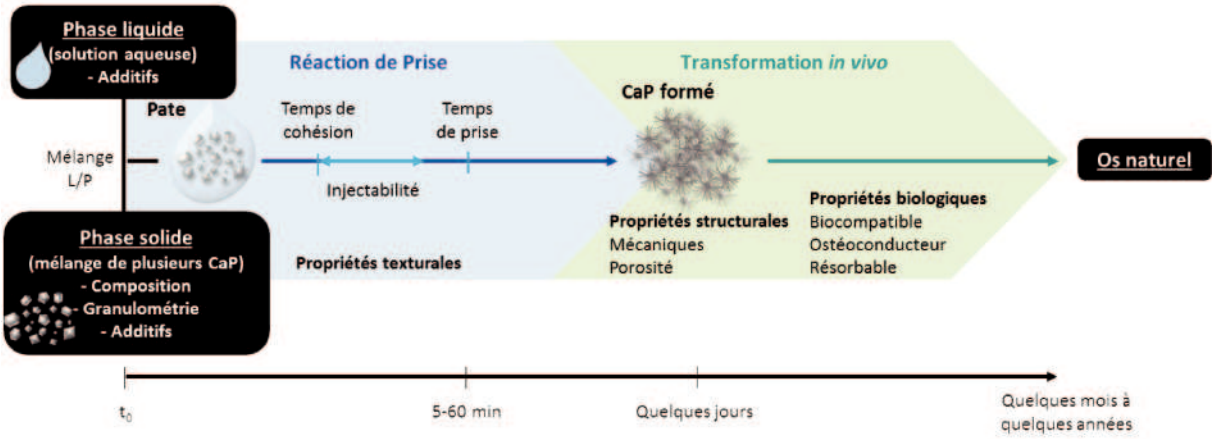


Figure 6 : Évolution des *propriétés intrinsèques d'un CPC au cours du temps. Figure adaptée*[63]

Les temps de prise

Les temps de prise sont des paramètres essentiels à la caractérisation texturale du ciment. En effet, ce paramètre permet de caractériser le temps nécessaire de maturation de la pâte pour obtenir un solide relativement résistant. La réaction de prise d'un ciment pouvant prendre quelques jours, la mesure de ce temps, quant à elle, est réalisée à un stade précoce de cette réaction. Généralement, les temps de prise sont déterminés en utilisant des méthodes normées telles que la méthode des aiguilles de Gillmore[64] (ASTM C266-08) et la méthode des aiguilles de Vicat[65] (ASTM C191-92). Ces méthodes permettent d'estimer visuellement, par des mesures de pression statique, la vitesse de prise du ciment. Concrètement, il est possible de mesurer un temps de prise lorsqu'une aiguille (dont le diamètre et le poids sont définis) ne laisse plus de traces visibles d'indentation à la surface du ciment. Le dispositif des aiguilles de Gillmore (Figure 7) est constitué de deux aiguilles, la première, large et légère, permet de mesurer le temps de prise initial noté t_i, et la seconde, fine et lourde, mesure le temps de prise final noté t_f. En pratique, le ciment doit être implanté par le chirurgien avant le t_i et la plaie doit ensuite être refermée avant le t_f. Entre ces deux temps, il est primordial de ne pas toucher le ciment auquel cas des craquelures pourraient apparaître dans le ciment une fois durci[53] ainsi que des fuites du biomatériau vers des structures proches. Ceci, implique de prendre en compte des facteurs environnementaux comme la température et l'humidité de l'air qui peuvent modifier la vitesse de la réaction de prise. Il est donc nécessaire de veiller à garder ces facteurs constants pour pouvoir comparer les résultats obtenus.

Ces méthodes sont simples mais opérateur-dépendantes.[66] De plus, elles sont adaptées uniquement aux ciments dont la résistance finale à la compression est 5 à 10 fois plus importante que la pression testée.[52] Pour finir, la mesure des temps de prise renseigne exclusivement un temps donné de la réaction de prise mais ne permet pas d'en prédire la fin.

La prise des ciments phosphocalciques peut également être suivie à l'aide de différentes techniques.[67] La diffraction des rayons X (DRX),[58,68,69] la spectroscopie IRTF[70] et la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide[71–73] sont des analyses visant à observer la transformation chimique, permettant ainsi de comparer produit de départ et produit final. D'autres études, s'intéressent à l'évolution des propriétés mécaniques et rhéologiques ou encore au processus de cristallisation (microscopie à balayage, MEB).[61] Pour ces différentes techniques citées, il est nécessaire de stopper la réaction de prise du ciment avant d'analyser l'échantillon. Néanmoins, cette réaction peut être suivie à l'aide de méthodes non destructives comme la calorimétrie,[74,75] les ultrasons[76,77] ou l'impédance haute fréquence.[71,72]

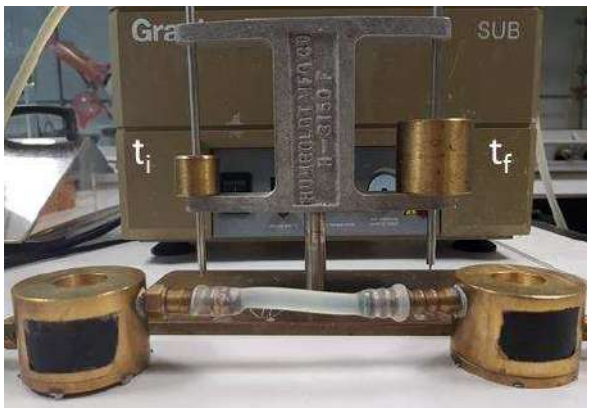


Figure 7 : Dispositif des aiguilles de Gillmore

L'injectabilité

La possibilité d'injecter la pâte de ciment directement in situ dans le site d'implantation reste un avantage considérable comparé aux céramiques. Cette qualité permet de pratiquer des chirurgies de type mini-invasive réduisant en conséquence les risques liés à l'implantation, la douleur et la période de convalescence du patient.

L'injectabilité est définie par la capacité de la pâte de ciment à être extrudée d'une seringue dont l'orifice de sortie est équipé d'une aiguille, d'une canule d'injection…[9,78] Puisqu'il n'existe pas de protocole normé pour la mesure de ce paramètre, il est alors possible de le déterminer selon les méthodes suivantes :

- La mesure du pourcentage de la masse ou du volume extrudable de ciment,[78]
- La mesure de la force nécessaire pour extruder la pâte de ciment,
- La mesure de la pression d'injection.[79]

L'injectabilité mesurée dépend de plusieurs paramètres : géométrie de la seringue, équipement de sortie, température, viscosité, ratio L/P, vitesse d'injection, forme des particules et de l'avancement de la réaction de prise au moment de la mesure.

Principal atout vis-à-vis des céramiques, l'injectabilité des ciments phosphocalciques reste encore limitée. En effet, il est fréquent de rencontrer lors de l'extrusion, un phénomène de séparation de phase nommé « filter-pressing ».[9] Ce phénomène va engendrer une variation du ratio L/P au cours de l'extrusion. Au début de l'injection, la pâte fluide contenant une majorité de liquide est extrudée entraînant la formation d'un solide non injectable par une force raisonnable. Des solutions ont été envisagées telles que :[80] l'ajout d'additifs (polymères naturels ou synthétiques),[81–83] le cobroyage de la phase solide, l'augmentation du ratio L/P,[78,84] la forme des particules[85] et l'avancement de la réaction de prise au moment de la mesure. Quelle que soit la modification choisie pour améliorer l'injectabilité, cette dernière engendrera des modifications sur toutes les propriétés intrinsèques du ciment.

La cohésion

Dès son implantation en site osseux, le CPC se retrouve au contact direct des fluides biologiques. Ces derniers vont laver le biomatériau et peuvent induire la désintégration et/ou le délitement de celui-ci. Pour éviter ce phénomène, il est indispensable que les CPCs aient une parfaite cohésion. Le temps de cohésion est défini par le temps minimal à partir duquel le ciment garde son intégrité géométrique sans aucune dégradation dans une solution aqueuse (généralement une solution de Ringer). En pratique, le temps de cohésion est mesuré à partir d'un ciment préalablement mélangé et injecté dans une solution à différent temps. L'observation du produit permet de vérifier son aspect après le durcissement. Le temps de cohésion est atteint dès lors qu'aucun délitement n'est observé que ce soit durant le premier contact avec le liquide ou durant le durcissement. Cette mesure est manipulateur-dépendant.

Dans le but de permettre au chirurgien d'injecter et de façonner le ciment dans le défaut osseux, ce temps doit être relativement cours et si possible avant le t_i. Or, dans le cas des ciments apatitiques, le temps de cohésion est souvent long. Afin d'améliorer cette propriété sans altérer la réaction de prise, des études ont montré qu'il était possible d'incorporer des additifs soit dans la phase solide, soit dans la phase liquide de départ. Ces promoteurs de cohésion[86] peuvent être du chitosan,[87] de l'alginate de sodium,[88] du xanthane, de l'hyaluronate de potassium[89] ou encore de l'hydroxypropylméthycellulose (HPMC).[82]

La porosité

Les CPCs sont des matériaux poreux. Cette caractéristique est issue des espaces libres entre l'enchevêtrement des cristaux précipités et est définie par le rapport de ces espaces libres sur le volume total du matériau. Elle dépend de la taille, de la forme et de l'interconnectivité des pores. Il est possible de mesurer la porosité soit par l'intrusion d'un liquide (porosimétrie mercure), soit par celle d'un gaz (argon, diazote, pycnométrie hélium) ou encore par observation (MEB). La taille des pores est classée selon trois classes : la microporosité (< 10 µm), la mésoporosité (entre 10 µm et 100 µm) et la macroporosité (> 100 µm).
Alors que la porosité peut-être une limite pour leur utilisation dans des applications où une résistance mécanique importante est requise, elle est cruciale dans d'autres applications. En effet, la porosité joue un rôle important dans l'activité cellulaire et en conséquence dans la résorption du biomatériau. En général, les formulations commerciales présentent des porosités de l'ordre de 40 à 50 % qui correspondent principalement à de la microporosité. La macroporosité de ces matériaux trop faible, restreint la pénétration des fluides biologiques ce qui engendre une résorption osseuse lente et couche par couche (de l'extérieur vers l'intérieur). Afin d'augmenter la surface disponible à la bioactivité cellulaire, des additifs y ont été intégrés tels que des polymères biodégradables,[90,91] des protéines,[92,93] de la glace,[94] des particules solubles[95,96] ou encore des produits effervescents.[97] De plus, il a été démontré que cette porosité fait des ciments phosphocalciques un bon support pour la libération contrôlée de principe actif.[98] Néanmoins, la présence des pores au sein des matériaux à tendance à favoriser la formation de fissures et donc à diminuer les propriétés mécaniques du ciment une fois durci.

La résistance mécanique

Les ciments phosphocalciques sont utilisés en tant que biomatériau pour le comblement et le renforcement osseux, dans cette voie il est primordial qu'ils possèdent des propriétés mécaniques minimales. Ces dernières résultent de la réaction de prise grâce à l'enchevêtrement des cristaux.
Il existe deux tests normés décris dans les fiches ASTM pour mesurer la résistance à la compression et la résistance à la traction diamétrale. Pour effectuer ces mesures, il est nécessaire de préparer des éprouvettes de ciment durci. Pour ce faire, une fois gâchée, la pâte de ciment est introduite dans un moule, lui-même plongé dans une solution isotonique (NaCl à 0,9 % en masse) à 37 °C, dans le but de se rapprocher au maximum des conditions biologiques. L'évolution des propriétés mécaniques peut-être suivie à l'aide de mesures réalisées à différents

temps de la réaction de prise du ciment. Néanmoins, cette réaction ne durant que quelques jours, la mesure est généralement effectuée à un temps unique : entre 24 et 72 h.

Puisqu'ils sont injectés directement au contact de l'os trabéculaire, il est souhaitable que ces ciments aient une résistance au moins similaire à cet os, soit environ 10 MPa.[99] De manière générale, les ciments commercialisés possèdent une résistance à la compression qui varie de 10 à 100 MPa,[100,101] tandis que la résistance à la traction, elle, varie de 1 à 10 MPa. Cette faible résistance accentue le caractère fragile des ciments phosphocalciques qui font d'eux de mauvais candidats pour des zones d'implantations subissant de fortes sollicitations mécaniques.

2.3. Applications en chirurgie osseuse

Il existe de nos jours diverses applications pour les ciments phosphocalciques. Utilisés à l'origine comme matériaux de comblement osseux, ils permettent également le maintien mécanique dans le cas d'une chirurgie de fusion osseuse ou encore une stabilité immédiate et à long terme d'un implant osseux.

2.3.1. Comblement osseux

La cimentoplastie est une intervention qui consiste à injecter un ciment à travers un trocart dans le but de traiter une fracture ou une zone ostéolytique ou tumorale. Ainsi, les CPCs sont utilisés comme traitement de choix pour de nombreuses pertes de substances osseuses en chirurgie orthopédique, dentaire et maxillo-faciale.

En chirurgie orthopédique, les CPCs sont utilisés pour des comblements de défauts osseux soit (i) post-traumatiques du plateau tibial[102] ou de la hanche[103] soit (ii) provoqués par des maladies osseuses[104] comme l'ostéoporose[105] ou soit (iii) créés par des zones de prises de greffons iliaques.[106] De la même manière, en chirurgie dentaire et maxillo-faciale, les CPCs sont utilisés pour des comblements parodontaux et pour des augmentations de la crête alvéolaire,[107,108] comblements de la mastoïde[109,110] après curetage et des trous de trépan crânien.[111] Il reste nécessaire, néanmoins, de prendre en compte de nombreux facteurs tels que le volume et la localisation du défaut osseux à combler, les contraintes mécaniques, le type de chirurgie, l'âge du patient…

La vertébroplastie et la cyphoplastie sont des techniques chirurgicales mini-invasives permettant de stabiliser une fracture vertébrale par l'injection de ciment. La lésion des vertèbres peut intervenir de différentes façons soit par accident engendrant des fractures soit par tassement vertébral dû à une décalcification osseuse (comme l'ostéoporose). Lors de ces

interventions, l'objectif est double : (i) consolider la fracture et (ii) diminuer les douleurs. Elles permettent ainsi de faciliter le déplacement du patient. Les ciments osseux les plus souvent utilisés lors de ces opérations sont des ciments acryliques comme le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Le succès de ce matériau est basé sur ses propriétés mécaniques et texturales ainsi que sur son effet antalgique quasi immédiat. Cependant, il a été mis en évidence un taux élevé de complications variant de 1 à 10 %.[112,113] Par exemple, ce matériau étant fortement exothermique, il peut engendrer des blessures thermiques des tissus environnants, causant potentiellement des dommages neurologiques. De plus, de par sa résistance mécanique très élevée, il a été aussi observé un risque de fracture aux niveaux adjacents. Afin de pallier ces complications, de nouveaux types de ciment à base de phosphate de calcium ont été proposés comme alternatives au PMMA.[114,115] Dans cette voie, d'après des essais biomécaniques in vitro[116] et cliniques[117] sur des vertèbres lombaires, il a été démontré à la suite d'une cyphoplastie avec différents matériaux (PMMA, PCa et silicone) que la résistance en compression du PCa ne différait pas significativement de celle du PMMA. Par ailleurs, un autre avantage à cette utilisation en cyphoplastie est la possibilité d'éviter la fusion vertébrale de certains segments lombaires.[118]

2.3.2. Fusion et arthrodèse

D'autres utilisations cliniques des CPCs sont les fusions osseuses et plus particulièrement lors des protocoles d'arthrodèse. Cette intervention chirurgicale consiste en la fusion de plusieurs os afin de bloquer une articulation lésée, le but premier étant de soulager une douleur intraitable par des méthodes conventionnelles et de corriger une déformation (comme la scoliose).
Quelle que soit la technique utilisée pour obtenir une fusion entre deux os, il est nécessaire de procéder en deux étapes :

- L'ostéosynthèse qui permet la stabilisation de la zone osseuse rendue instable par la pose d'un matériau (plaque, vis, broche en titane),
- L'implantation de substitut osseux naturel (comme les greffes) ou synthétique (comme les CPCs).

De nos jours, les CPCs sont utilisés pour les arthrodèses du poignet,[119] des vertèbres (cage de fusion),[120] le réalignement d'une scoliose[121] ou encore lors de fractures.

2.3.3. Ancrage osseux

Plus récemment, les CPCs ont été utilisés dans le cadre d'ancrage osseux. Cette utilisation permet de fixer les implants buccaux, les implants en titane[122,123] et majoritairement les vis[124–126] dans des dispositifs utilisés lors des chirurgies orthopédiques telles que la cyphoplastie ou encore l'arthrodèse. Le ciment permet alors un double ancrage, le premier entre l'implant et le ciment et le deuxième entre le ciment et l'os, assurant ainsi une stabilité immédiate de l'implant qui se prolongera dans le temps grâce au processus de remodelage osseux.

2.4. Les limites

De nos jours, les CPCs sont considérés comme des matériaux de référence pour de nouvelles approches chirurgicales telles que des protocoles mini-invasifs ou percutanés. Ces biomatériaux ont l'avantage de s'intégrer parfaitement à la forme du défaut osseux contrairement aux granules de céramique,[127] optimisant ainsi le contact os-biomatériaux dans des sites d'implantations géométriquement complexes. De plus, les CPCs sont fondés sur un mélange de composés minéraux PCa qui réagissent ensemble pour fournir un matériau qui durcit in situ après l'injection. Cette réaction contrairement aux ciments PMMA est non exothermique.

Que ce soit au niveau des propriétés texturales, structurales ou encore biologiques, ces biomatériaux comportent certains inconvénients. Tout d'abord concernant les propriétés texturales, si la pâte de ciment une fois gâchée manque de cohésion, ceci peut entraîner une séparation des phases lors de la lixiviation par les fluides biologiques. Au niveau structural, bien que les CPCs aient une résistance mécanique supérieure aux céramiques, cette dernière reste limitée (résistance en traction quasi nulle) et demeure éloignée de celle de l'os, limitant ainsi leur utilisation. De plus, ces biomatériaux possèdent une macroporosité et un potentiel ostéogénique réduits par rapport aux greffes osseuses qui limitent par la suite la réhabilitation cellulaire et donc la repousse osseuse.

Ainsi, dans le but d'améliorer les performances des CPCs, il a été imaginé d'y intégrer des molécules actives d'intérêt biologique. Ces nouveaux substituts sont appelés dispositifs combinés.

3. Les dispositifs osseux combinés

Actuellement, les recherches visent à améliorer, en premier lieu, les propriétés mécaniques et texturales des ciments phosphocalciques et en second lieu à apporter une réponse thérapeutique pour des contextes cliniques délicats comme les infections, l'ostéoporose, etc.

Ainsi, les systèmes combinés alliant substituts osseux et molécules actives permettent de jouer un double rôle une fois ces derniers implantés. Leur premier rôle, en tant que substituts osseux, est d'apporter une résistance mécanique suffisante (10 MPa au minimum) au site osseux lésé. Leur second rôle, grâce aux molécules actives incluses dans leur matrice, est de délivrer localement un principe actif. De ce fait, l'incorporation de molécules actives permet dans un cas, de stimuler la formation d'os néoformé ou dans un second cas de cibler des pathologies (comme l'ostéoporose) ou des traumatismes squelettiques spécifiques (comme les fractures). La libération de PA directement in situ va permettre d'améliorer leurs biodisponibilités, leurs efficacités et leurs tolérances par rapport à un traitement par voie systémique.

3.1. Méthodes d'association

L'un des avantages des CPCs résulte dans la réaction de prise qui s'effectue à la température corporelle sans dégagement de chaleur. De ce fait, l'incorporation de PA ou de cellules est réalisable sans aucune dénaturation thermique lors de la phase de préparation du ciment.

L'efficacité du dispositif combiné va dépendre de plusieurs facteurs comme la microstructure du matériau (porosité, surface spécifique, tortuosité, perméabilité), la solubilité du principe actif, la nature des interactions entre ce principe actif et la matrice ainsi que la dégradation éventuelle de la matrice. Pour les CPCs, la méthode d'association du PA est déterminante pour la distribution future de ce dernier au sein du biomatériau. La Figure 8 ci-après résume les différents modes d'associations possibles entre une molécule active et un ciment phosphocalcique.[11] Le principe actif peut être associé selon deux approches différentes (i) soit dans les constituants avant la phase de mélange du ciment (ii) soit après la cristallisation du CPC lorsque le processus de prise est terminé. Dans le premier cas, la molécule active peut être incorporée dans la phase solide (par substitution, par chimisorption ou par dispersion dans la poudre) ou dans la phase liquide (par dissolution ou par dispersion). Dans les deux cas, le principe actif est réparti dans le volume entier du matériau bien que cette distribution soit plus homogène lorsque la molécule active est incorporée dans le durcisseur. La seconde approche consiste à associer le bloc de CPC par imprégnation avec une solution contenant le PA. Cette méthode nécessite un pré-durcissement du ciment ce qui compromet les propriétés

d'injectabilité de ce dernier. Néanmoins, ce type d'association conserve des avantages considérables par rapport aux céramiques classiques comme la microstructure des CPCs qui s'avère être un atout pour le chargement en PA.

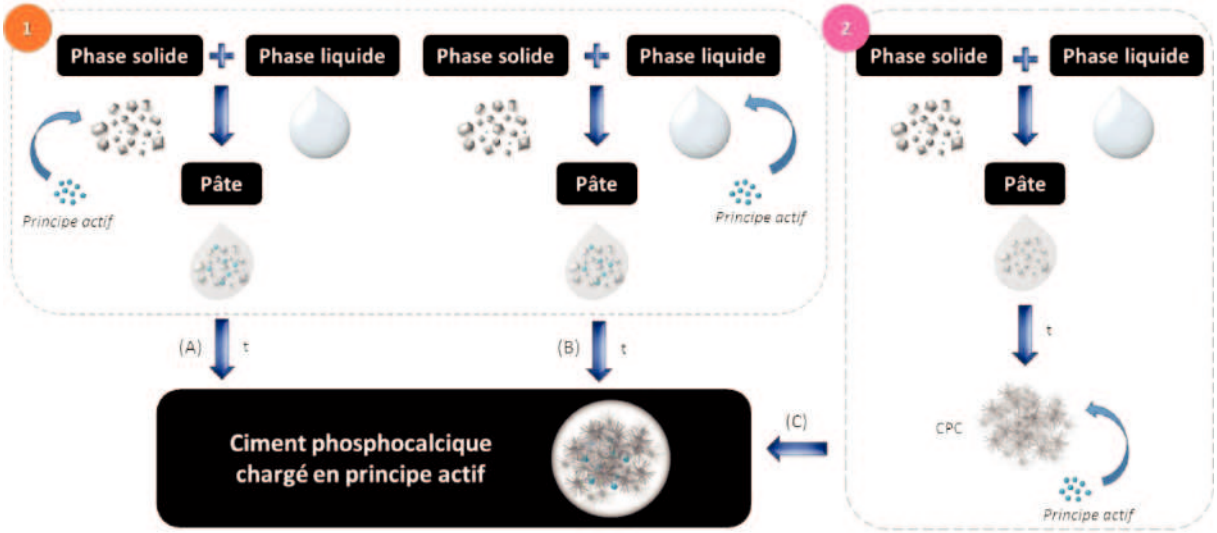


Figure 8 *: Méthodes d'association d'un CPC et d'un principe actif.* 1. Association avant la préparation du ciment, le PA est intégré soit dans la phase solide du ciment (A) ou solubilisé dans le durcisseur (B). 2. Association après la prise du ciment par imprégnation du CPC avec une solution contenant le PA (C)[11]

Un point important lors de l'association d'une molécule active est de connaître la forme sous laquelle cette dernière réside ainsi que sa distribution dans la matrice. En effet ces caractéristiques seront décisives et détermineront la cinétique de libération du principe actif. Comme mentionné précédemment, la dissolution du PA dans une phase liquide appropriée offre une distribution plus homogène de la molécule active. Dans le cas où la molécule est intégrée dans les réactifs de la phase solide, lors de l'ajout de la phase liquide (durcisseur), une compétition aura lieu entre l'hydrolyse des réactifs du ciment et la dissolution du PA. De ce fait la dissolution du PA sera partielle et dépendra fortement de la solubilité de ce dernier dans le durcisseur. Ainsi, lors de la réaction de prise, la majeure partie du PA sera piégée par l'enchevêtrement des cristaux de la nouvelle phase minérale.

Pour résumer, le PA peut se trouver dans trois situations différentes représentées ci-après (Figure 9) : (i) dissous dans le liquide (ii) adsorbé ou lié chimiquement à la surface des cristaux ou (iii) sous forme solide. Dans ce dernier cas, le PA peut être sous forme d'agrégats amorphes et/ou sous forme de cristaux. De plus, il est important de considérer que la réaction de prise du

ciment engendre des modifications de pH et de force ionique de la phase liquide, pouvant entraîner la précipitation de la molécule active initialement dissoute dans cette phase.

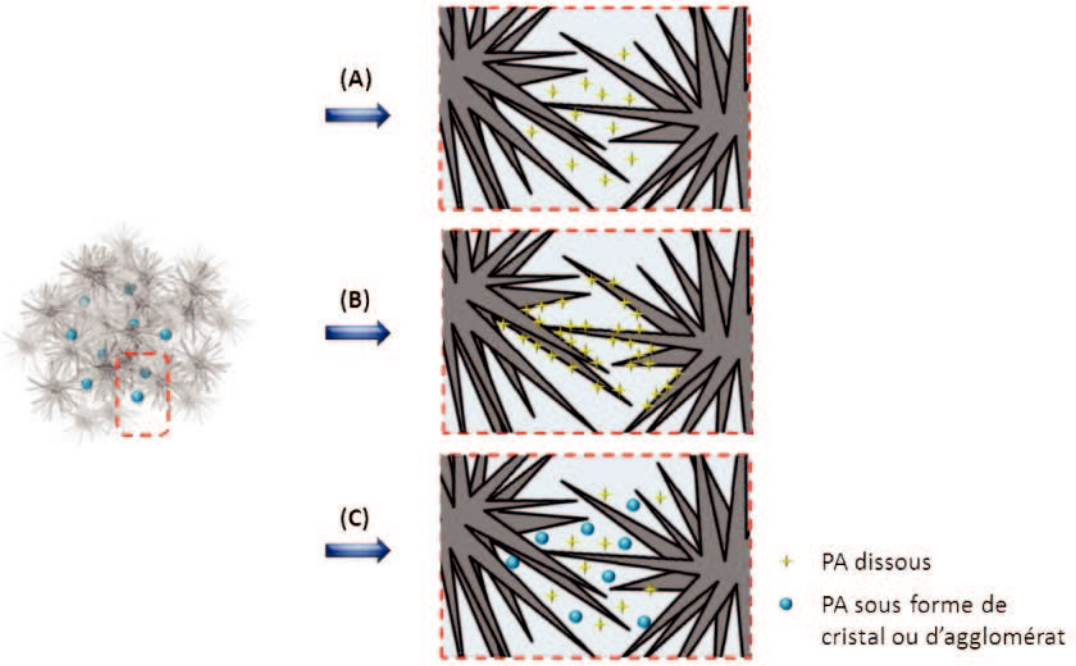


Figure 9 : Représentation schématique des formes du PA dans le CPC : (A) dissous dans la phase liquide, (B) adsorbés ou liés chimiquement à la surface des cristaux de PCa et (C) sous forme solide[11]

3.2. Modification des propriétés intrinsèques des CPCs

Le choix de la méthode d'association doit être adapté au contexte clinique visé et à la cinétique de libération souhaitée. En effet, dans les stratégies décrites précédemment, les CPCs possèdent des propriétés texturales différentes.

Dans la première voie, où le PA est intégré dans les réactifs de départ, toutes les propriétés texturales, telles que le temps de prise, la cohésion, l'injectabilité, les propriétés mécaniques et la porosité, vont être modifiées et ceci en fonction de la proportion de PA ajouté. Les caractéristiques finales du matériau comme la cristallinité, la taille des cristaux ou encore la porosité seront également impactées par cette association. Pour résumer, l'ajout d'une molécule active peut engendrer des changements sur la cinétique de prise, les propriétés rhéologiques et la microstructure modifiant ainsi les performances cliniques du biomatériau. Par conséquent, la cinétique de libération du PA sera liée à ces différentes modifications. De plus, il n'existe pas de règle générale quant à la prédiction des effets de l'association d'un principe actif avec un ciment phosphocalcique. Ces variations vont dépendre des propriétés physico-chimiques du PA. Les molécules qui interagissent avec les ions calcium ou phosphate en solution, par

exemple, vont soit se complexer[128] aux ions présents dans l'environnement, soit coprécipiter[129] lors de la réaction de prise, ce qui entraînera un retard de la cinétique de prise du produit final. Dans la seconde voie, lorsque la matrice est imprégnée par le PA, la réaction de prise du matériau n'est plus en évolution, la microstructure est donc stable pendant toute la période de libération, en dehors du phénomène de dégradation. Ainsi, les modifications apportées sur le biomatériau mettent en évidence l'importance d'étudier la cinétique de libération des principes actifs dans des conditions se rapprochant au maximum des conditions réelles d'implantation.

3.3. Cinétique de libération

Les CPCs sont considérés comme des matériaux qui, lorsqu'ils sont en contact avec les fluides biologiques, ne gonflent pas et ne se dégradent pas. En effet, la plupart des CPCs sont classés comme matériaux non résorbables et dans le cas contraire, la cinétique de dégradation lente des CPCs permet de la négliger vis-à-vis de la cinétique de libération des PA. Cette dernière peut s'effectuer selon différents mécanismes (Figure 10) : (i) la désorption (ii) la diffusion (iii) la dégradation du support.

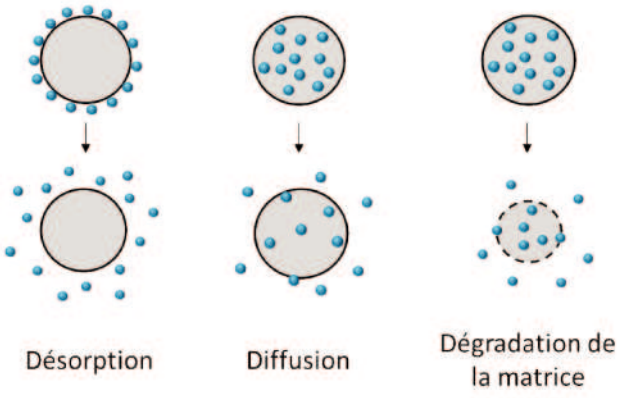


Figure 10 : Représentation schématique de la libération de PA en fonction des différents mécanismes

Quel que soit le type d'association choisi entre le PA et le CPC, la microstructure poreuse du biomatériau favorise la pénétration des fluides biologiques environnant et donc la libération de molécule active dans l'organisme. Par conséquent, il est supposé que le mécanisme qui a lieu principalement dans ce genre de matrice soit la diffusion.

Dans la littérature, le modèle le plus couramment utilisé pour étudier la cinétique d'un principe actif au travers d'une matrice est le modèle d'Higuchi.[10,130–132] Développé à l'origine pour la diffusion de PA contenu dans des pommades,[130] le modèle fut étendu à d'autres systèmes

comme des matrices solides contenant un principe actif sous forme solide et dont la libération de ce dernier se fait par lixiviation.[130] De plus, ce modèle de diffusion est applicable uniquement si (i) la concentration initiale en PA contenu dans la matrice est beaucoup plus élevée que la solubilité du PA (le PA est donc à l'état d'un solide dispersé dans la matrice) (ii) la taille du PA doit être largement inférieure à la taille du dispositif de libération (iii) le matériau ne doit pas ni gonfler ni se dégrader et (iv) le coefficient de diffusion du PA est constant (ne dépend pas du temps ou de la position). Dans cette situation, la quantité de PA libérée après un temps t (notée Mt) peut être calculée selon l'équation suivante :

$$M_t = AM_0[DC_s(2C_0 - C_s)t]^{1/2}$$

Où M_0 est la quantité totale de PA, A est la surface de la matrice, D est le coefficient de diffusion du PA dans la matrice, C_s est la solubilité du PA et C_0 est la concentration initiale de PA. De manière simplifiée, cette équation peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{M_t}{M_0} = at^{0,5}$$

Où a est la constante de diffusion d'Higuchi.

Cependant, il apparaît nécessaire de se soucier de la porosité des CPCs qui peut être modifiée une fois le biomatériau implanté in situ. En effet, pour les ciments brushitiques ou contenant des carbonates, la résorption est beaucoup plus rapide. Par conséquent, lors de la dissolution des PCa de la matrice, la porosité intrinsèque augmente et engendre une zone de contact PA/fluide biologique plus grande provoquant ainsi une solubilisation du PA et une mobilité accrue. De ce fait, le mode de libération ne peut plus être modélisé selon Higuchi. Ainsi, Korsmeyer et Peppas ont développé un modèle simple permettant de décrire la libération d'un principe actif.[133,134]

$$\frac{M_t}{M_0} = kt^n$$

Où k est une constante qui inclut les caractéristiques géométriques et structurelles de la matrice et n est l'exposant de libération permettant de décrire le mécanisme de libération. En effet, pour une géométrie type couche mince, si la valeur de n est inférieure à 0,5, ceci correspond à une diffusion Fickienne, en revanche, si la valeur de n est comprise entre 0,5 et 1, ceci correspond à une diffusion non-Fickienne. Pour des géométries différentes telles qu'un cylindre ou une sphère, la constante n prend comme valeur 0,45 et 0,43 respectivement. Pour finir, dans le cas d'une matrice de forme cylindrique, le mécanisme correspond à une diffusion selon la loi de

Fick lorsque 0,45 ≤ n, en revanche si cette constante est comprise entre 0,45 et 0,89, la cinétique suit alors une diffusion dite « non-fickienne », c'est-à-dire que la libération sera soumise aux deux phénomènes suivants (i) la diffusion du PA et (ii) l'érosion de la matrice. Dans le cas où n = 0,89 ; le mécanisme de libération est qualifié de « Cas II transport » et si n > 0,89 ; il nommé « super Cas II transport » et correspond à une cinétique d'ordre zéro.[135] L'intégralité des valeurs de n est décrite dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3 *: Valeurs de n en fonction du mécanisme de libération d'un PA à partir de matrice de* géométrie différente[135,136]

Valeur de n			**Mécanisme de libération**
Film	Cylindre	Sphère	
0,5	0,45	0,43	Diffusion fickienne
0,5 < n < 1,0	0,45 < n < 0,89	0,43 < n < 0,85	Diffusion non fickienne
1,0	0,89	0,85	Cas II transport
1,0 < n	0,89 < n	0,85 < n	Super Cas II transport

De plus, il est à noter que seules les valeurs de $M_t/M_0 < 60$ % sont utilisables pour calculer la valeur de n.[135] Ce modèle est utilisable dans le cas où le processus de libération est mal connu ou lorsque ce processus correspond à l'association de plusieurs phénomènes différents.

Un autre modèle décrit par Tung[137] interprète la libération de PA comme un phénomène constitué de trois étapes successives. La première étape serait définie selon la loi de Higuchi où la masse du PA libérée est proportionnelle à $\sqrt{t}$. Ensuite dans la deuxième étape, la libération du PA est proportionnelle au temps, cette étape dépend du type de la molécule active employée ainsi que de sa solubilité. Enfin, la vitesse de libération est considérablement diminuée jusqu'à l'obtention d'un plateau.

3.4. Exemples de dispositifs combinés

L'association de ciments osseux phosphocalciques avec des molécules bioactives a été étudiée pour trois objectifs cliniques majeurs dans l'environnement osseux : la diffusion locale de principes actifs, la promotion de l'ostéointégration ou l'augmentation osseuse par la libération de facteurs de croissance et la prévention de la résorption osseuse par l'incorporation et la libération ultérieure in vivo d'agents antirésorptifs tels que les bisphosphonates.[138] Afin de

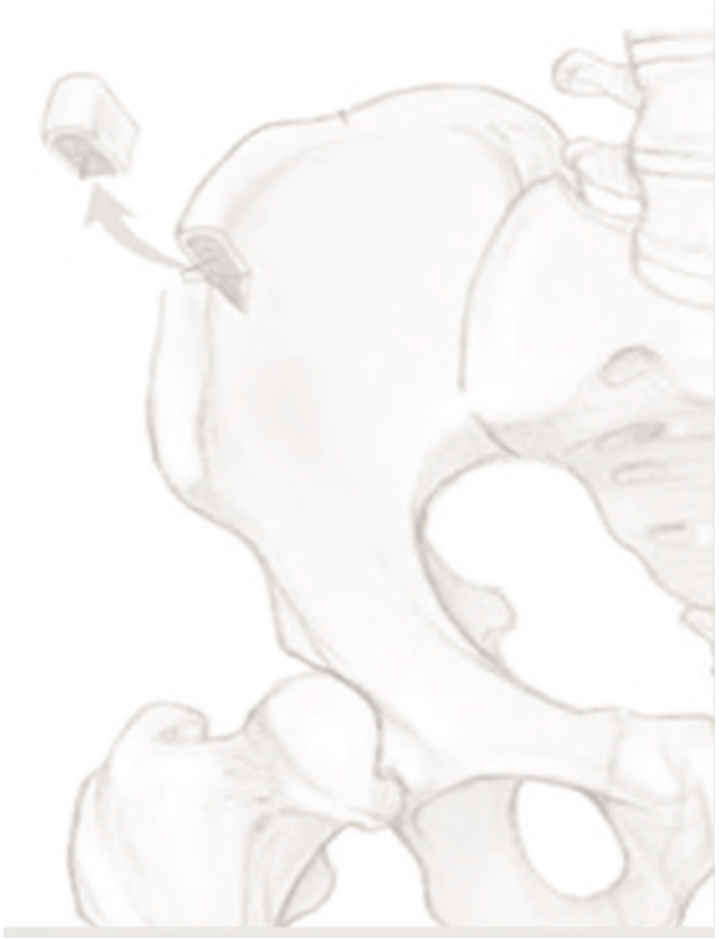
répondre à ces différentes problématiques, trois types de PA ont été identifiés (i) les PA ayant un faible poids moléculaire (ii) ceux ayant un haut poids moléculaire et (iii) les ions.

Les molécules actives à faible poids moléculaire sont utilisées pour traiter les situations pathologiques telles que les infections, les tumeurs, etc. Majoritairement, les biomolécules les plus étudiées sont les antibiotiques en raison de leur domaine d'application important. En effet, les antibiotiques permettent de traiter les infections osseuses mais aussi de prévenir les éventuelles infections pouvant résulter d'une chirurgie. Parmi les PA incorporés dans des ciments phosphocalciques les plus utilisés, on compte la gentamicine, la vancomycine ou encore la tétracycline.[139–142] Les analyses in vitro[141] et in vivo[143,144] ont permis de démontrer qu'une fois incorporés dans le ciment, les PA n'ont pas perdu de leur activité. Hormis leur application pour les infections osseuses, les CPCs sont également utilisés comme vecteurs d'anti-inflammatoires,[145,146] d'antalgiques,[147–149] d'anticancéreux[150,151] ou encore d'agents anti-résorptifs.[71,138,152] Dans cette thèse les CPCs combinés avec des molécules à visées antalgique, anticancéreuse et anti-résorptive seront davantage détaillés dans les chapitres suivants.

L'association d'un ciment phosphocalcique avec des facteurs de croissance ou des protéines[153] permet d'améliorer d'une part, l'ostéointégration du biomatériau et d'autre part, sa résorbabilité[72] sur le site d'implantation. Ces problématiques soulèvent une difficulté lors de l'incorporation de ce genre de molécules au sein de la matrice. En effet, il est compliqué de savoir comment intégrer la molécule sans entacher sa bioactivité, ainsi que de prouver l'intégrité de ces macromolécules après leur association au sein des CPCs.

Concernant l'incorporation d'ions dans les CPCs, les visées thérapeutiques concernent, soit le processus de remodelage osseux avec le strontium,[154,155] les silicates,[156] le magnésium,[157] le gallium,[23,24] le chrome[158,159] soit les infections avec l'argent.[160] Lors de l'utilisation de ce type de ciment, il est nécessaire d'avoir au préalable bien étudié la cinétique de libération des ions afin de la corréler avec la guérison du site pathologique.

CHAPITRE II : CIMENT APATITIQUE A VISÉE ANALGÉSIQUE POUR LA RECONSTRUCTION OSSEUSE



Les patients pour lesquels une chirurgie de reconstruction osseuse est envisagée sont principalement des patients ayant déjà subi de multiples interventions et dont le parcours de soins est déjà long et douloureux. La douleur postopératoire apparaît comme l'une des principales complications,[12] celle résultant d'un prélèvement de tissu osseux notamment sur la crête iliaque est particulièrement sujet à risque de chronicisation. Cette douleur induite perturbe considérablement la convalescence du patient par la perte de mobilité qu'elle entraîne, compromettant ainsi fortement sa réhabilitation fonctionnelle[161,162] et augmentant notamment le séjour hospitalier. De ce fait, la qualité de vie et l'autonomie des patients s'en trouvent fortement altérées particulièrement pour les plus âgés. Il en résulte de multiples conséquences d'un point de vue thérapeutique, économique et social.

La physiopathologie de la douleur postopératoire est un mécanisme très complexe impliquant non seulement les mécanismes périphériques dus en partie à l'inflammation locale, mais aussi à des mécanismes centraux secondaires qui entretiennent la douleur. Afin de mieux prévenir le développement de la douleur chronique, il est nécessaire de prendre en charge la douleur le plus efficacement et le plus rapidement possible, c'est-à-dire pendant au minimum les quatre premiers jours postopératoires.[163–165]

1. Physiologie de la douleur

1.1. Définition

La douleur est définie selon l'IASP (International Association for the Study of Pain) comme « une sensation et une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en ces termes ». Cette douleur résulte d'un signal émis au niveau du site lésé et qui est ensuite reçu et analysé dans le cerveau. Elle est constituée d'un stimulus nociceptif transmis jusqu'au cerveau par le biais de différents neurones. Tout au long de son parcours, ce message est modulé. De plus, il est à l'origine des réflexes segmentaires moteurs (tel que le retrait) et végétatif (comme la tachycardie).

Il existe deux grands types de douleur :[166]

- La douleur aiguë,

  Elle est liée à une atteinte tissulaire brutale (comme un traumatisme, une lésion inflammatoire, etc.). Cette douleur est souvent associée à des manifestations neurovégétatives (tachycardie, sueurs, élévation de la pression artérielle) et à une anxiété. De plus, il est important de noter que le terme « aigu » caractérise la durée de la douleur (moins de 3 mois) et non son intensité,

- La douleur chronique.

  Elle est définie selon l'HAS (Haute Autorité de Santé) comme « un syndrome multidimensionnel exprimé par la personne qui en est atteinte ». Quelles que soient sa localisation et son intensité, la douleur est qualifiée de chronique lorsque qu'elle possède les spécificités suivantes (i) la persistance ou récurrence, qui perdure dans le temps (au-delà de 3 mois) et (ii) la détérioration progressive et significative des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient dans ses activités de la vie journalière. In fine, cette douleur perd donc son rôle de signal d'alarme et devient une maladie en tant que telle. Elle doit, alors, être prise en charge selon une démarche évaluative puis avec un traitement, souvent multimodal.

1.2. Caractéristiques de la douleur

La douleur peut se définir selon trois catégories : la douleur par excès de nociception, la douleur neuropathique, la douleur dysfonctionnelle.[166]

Cette douleur quel que soit son type, peut être continue ou discontinue et est déclenchée par des stimuli de diverses origines. Au cours d'une intervention chirurgicale, celle-ci induit la prolifération locale et générale de médiateurs de l'inflammation qui peuvent par la suite créer des lésions nerveuses. Cette association (inflammation et lésions nerveuses) engendre la composante hyperalgésique (Figure 11) qui s'établit au bout de quelques minutes et participe à majorer la sensation douloureuse. Le phénomène d'hyperalgésie correspond à une perception douloureuse anormalement intense d'un stimulus normalement douloureux. Il se caractérise toujours par sa modalité de stimulation (mécanique, thermique, chimique) ainsi que par le type de stimulus utilisé (touché, température, type de substance chimique, etc.). De manière générale, l'hyperalgésie s'associe à des phénomènes d'allodynie. Cette dernière correspond à la perception douloureuse d'une stimulation habituellement perçue comme non douloureuse.

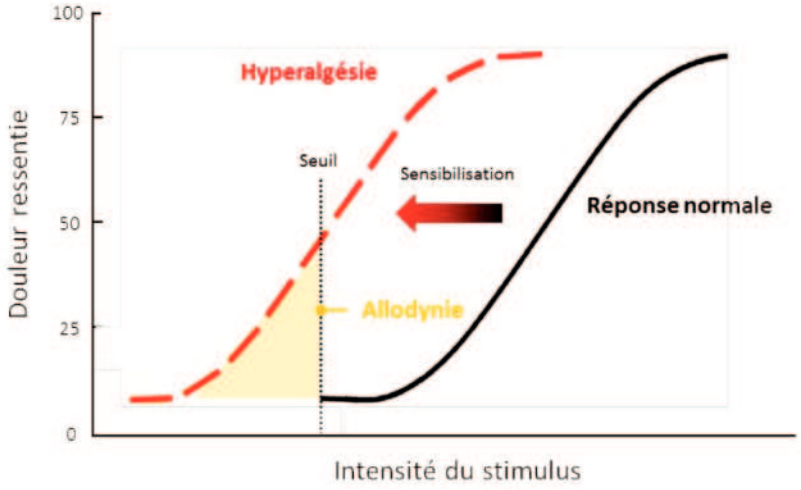


Figure 11 *: Illustration des phénomènes de l'hyperalgésie et de l'allodynie*[167]

Il est possible de différencier l'hyperalgie primaire (observée au niveau de la lésion, en zone inflammatoire) et l'hyperalgésie secondaire (observée à des sites distants non inflammatoires). L'hyperalgésie primaire résulte des phénomènes de sensibilisation périphérique alors que l'hyperalgésie secondaire reflète une hypersensibilisation du système nerveux central. Ce phénomène d'hypersensibilité centrale, souvent qualifié de « mémoire de la douleur », participe à la sévérité de la douleur postopératoire et est à l'origine de la chronicisation des douleurs chirurgicales.[168]

1.3. Spécificité de la douleur osseuse

Relativement mal exprimée par les patients, la douleur osseuse est souvent confondue avec des douleurs articulaires, musculaires ou neurologiques. Ces douleurs osseuses peuvent provenir de diverses origines telles que : les tumeurs osseuses (sarcome, myélome, métastase osseuse), la tuberculose osseuse, l'ostéoporose, la maladie de Paget, la maladie des os de verre, les ostéochondrites. Il est possible de distinguer deux types de douleur (i) la douleur mécanique qui provient généralement d'une lésion osseuse (telles que les fractures) et (ii) la douleur inflammatoire (que l'on peut retrouver dans l'ostéochondrite). Cette dernière prédomine lorsque le membre est au repos et est améliorée par le mouvement. À l'inverse, la douleur mécanique est déclenchée par la mise en mouvement du membre affecté et est calmée au repos. De plus, de simples micromouvements entraîneront le retour de la douleur. Elle est décrite comme aiguë et lancinante.[169]

Cette douleur ressentie est souvent caractérisée comme inégale en fonction du type de tissu touché, et la douleur ressentie lors d'une chirurgie osseuse est nettement supérieure à celle induite lors d'une chirurgie des tissus mous.[14,170] Le tissu osseux dispose d'un réseau nerveux complexe, relativement bien décrit dans la littérature,[171,172] constitué de fibres nerveuses sensitives et du système sympathique. Ces différentes fibres sont réparties de manière hétérogène entre le périoste, la moelle osseuse et l'os cortical (dans les canaux de Havers). Il apparaît que la partie la plus innervée du tissu osseux est le périoste, c'est pourquoi une simple distorsion de cette couche est une source majeure de douleur osseuse. En revanche, l'os cortical et la moelle osseuse dont l'innervation est moindre tiennent un rôle moins important dans ce phénomène.

La douleur osseuse provient de mécanismes divers tels que :[166]

- L'activation des fibres nerveuses par une contrainte mécanique,
- L'activation des fibres nerveuses par une inflammation locale,
- L'activation et la sensibilisation des fibres nerveuses par l'action des facteurs de croissance (NGF),
- La néoformation excessive de fibres nerveuses par les NGF,
- La composante centrale.

1.4. Cas particulier de la douleur lors d'un prélèvement osseux de la crête iliaque

La douleur postopératoire consécutive à une chirurgie de reconstruction osseuse est l'une des complications les plus fréquentes et sa mauvaise anticipation peut compromettre le succès global d'une intervention chirurgicale.

Dans la nécessité d'un comblement osseux, l'autogreffe est toujours considérée comme la méthode de référence.[3] La crête iliaque grâce à son accessibilité chirurgicale, à sa richesse d'os spongieux et à ses propriétés d'ostéoinduction qui lui sont conférées, est un site de prélèvement préférentiellement utilisé.[173] La prise du greffon est un geste chirurgical extrêmement douloureux et notamment dans les procédures où la crête iliaque osseuse est le site donneur.[4,12–16] Par ailleurs, cette douleur est généralement plus vivement ressentie au niveau du site de prélèvement qu'au niveau du site ayant subi l'intervention de comblement.[12] Cette morbidité postopératoire peut persister au-delà de quelques mois voire, même, quelques années

après l'intervention et est alors qualifiée de chronique. Plusieurs études ont démontré qu'après de nombreuses années, la douleur chronique entraîne des difficultés au niveau de la réhabilitation globale (activités récréatives et quotidiennes, activité sexuelle, réinsertion professionnelle…) et pouvait également entraîner une irritation lors du port des vêtements.[12,18] De plus, en raison de la complexité de l'opération et des traumatismes pouvant survenir au niveau des sites de connexion muscle-os, des anomalies postopératoires de la démarche des patients peuvent être observées.[174,175] Au début des années 90, des auteurs ont signalé un taux important de douleur chronique au niveau du site donneur (49 %) dans une série de 290 patients ayant subi une chirurgie de fusion lombaire. Cette dernière était qualifiée de sévère dans 51 % et « d'acceptable » dans 49 % des cas.[176] Plus récemment, des études ont rapporté que la douleur postopératoire était présente dans 2,8 à 49 % des patients opérés[5,177,178] et parmi ces derniers jusqu'à 39 % ont décrit une douleur postopératoire chronique.[17] Néanmoins, cette valeur reste encore contestée et est qualifiée comme surestimée. Ces contradictions proviennent de la difficulté à quantifier la douleur puisque sa mesure repose sur le témoignage du patient.

La prévention de la chronicisation de la douleur chez ces patients aux parcours de soins complexes est un enjeu majeur de la prise en charge anesthésique. Le rôle des anesthésiques locaux utilisés dans des blocs nerveux périphériques est bien décrit dans cette prise en charge, permettant une épargne morphinique. Cependant, la lourdeur des chirurgies de reconstruction osseuse rend souvent utopique la possibilité de « bloquer » toutes les zones douloureuses en postopératoire. Limité par les doses totales d'anesthésiques locaux, le site de prélèvement de crête iliaque ne bénéficie souvent pas de cette analgésie ciblée. Par ailleurs, il a été montré que la douleur postopératoire ne devient pas chronique si elle est contrôlée et minimisée pendant les 3 - 4 premiers jours postopératoires.[19] De plus, des données récentes suggèrent que la douleur chronique pourrait induire des changements au niveau du système immunitaire, en modifiant l'expression de certains gènes.[179] Cela pourrait indiquer un lien potentiel entre la douleur ressentie et le processus inflammatoire de guérison après une chirurgie osseuse.

En dépit des immenses progrès et malgré la connaissance des mécanismes de la douleur osseuse, sa gestion ainsi que sa prise en charge restent difficiles.

2. Gestion et prise en charge de la douleur osseuse

Nous avons vu précédemment que la douleur postopératoire n'était pas seulement due aux traumatismes engendrés par la chirurgie, mais également au développement de mécanismes d'hyperalgésie et d'allodynie.[167] Dès lors, la douleur postopératoire aiguë peut évoluer en douleur postopératoire chronique si elle n'est pas prise en charge par une analgésie adéquate.[180,181]

Le traitement conventionnel consiste en une association de thérapies non médicamenteuses (glaçage, immobilisation…) et médicamenteuses par voie systémique tel que le paracétamol, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le néfopam et les produits dérivés d'opioïdes ou par voie péri nerveuse (infiltration d'anesthésiques locaux avec ou non mise en place d'un cathéter péri-nerveux). Ces différents antalgiques sont classés en trois niveaux, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en fonction de l'intensité de la douleur à traiter (Figure 12).

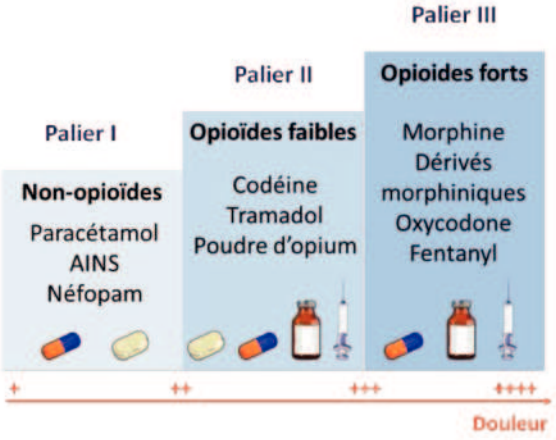


Figure 12 : Échelle thérapeutique de la douleur *selon l'OMS*

Le paracétamol n'est définitivement pas assez fort pour soulager la douleur postopératoire, alors que les AINS peuvent causer des troubles digestifs dont les plus fréquents sont les complications gastriques ;[182] des complications rénales et peuvent également retarder la cicatrisation osseuse.[183] Enfin, les opioïdes peuvent causer de multiples complications (constipation, insuffisance respiratoire, intolérance et dépendance) qui pourraient entraver la guérison et augmenter la durée d'hospitalisation.

2.1. Analgésie multimodale

Son principe consiste à associer des médicaments analgésiques et des techniques ayant des sites d'action différents et complémentaires, à l'origine d'interactions additives voire synergiques. La combinaison d'antalgiques agissant à des niveaux différents permet une analgésie plus complète et plus efficace. De ce fait, la dose de médicaments engagée peut se voir réduite tout en conservant une analgésie égale voire supérieure,[22] ce qui assure une réduction des effets délétères de chaque molécule.[21] Ce dernier point concerne tout particulièrement les morphiniques, dont l'action analgésique fait office de référence et provoque de nombreux effets secondaires comme des dépressions respiratoires ou une forte dépendance, chez l'individu traité. L'analgésie multimodale est ainsi également appelée stratégie d'épargne morphinique. Les chirurgies orthopédiques sont réputées comme extrêmement douloureuses et l'efficacité analgésique des dérivés morphiniques étant bien supérieure aux autres molécules, ces derniers sont alors indispensables dans ce cadre. Ainsi, leur utilisation en combinaison avec d'autres molécules a permis d'améliorer le vécu postopératoire des patients.[20]

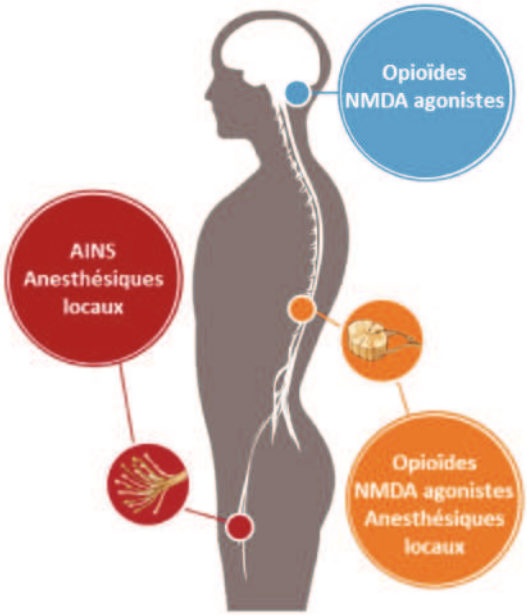


Figure 13 : Illustration des *sites d'action différents* et des molécules pouvant être utilisées dans *l'analgésie multimodale*

Les molécules analgésiques comprennent entre autres (Figure 13) : les opioïdes, les acides N-méthyl-D-aspartique (NMDA) antagonistes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anesthésiques locaux. Les modes d'actions sont également représentés sur la Figure 13.

Dans ce chapitre, seuls les anesthésiques locaux seront détaillés, puisque leur effet analgésique fait l'objet de l'étude présentée dans cette thèse.

2.2. Anesthésiques locaux

Dans une stratégie d'épargne morphinique, les anesthésiques locaux sont une alternative, utilisés, soit in situ par les chirurgiens soit autour des nerfs qui innervent le site opératoire par les anesthésistes en peropératoire comme en postopératoire immédiat. Cette administration locale fournit une analgésie au site cible avec des effets systémiques limités. Il a été démontré que l'administration in situ d'un anesthésique local est une approche intéressante pour prévenir la douleur chronique et recherchée par les cliniciens puisqu'elle permet de réduire la consommation excessive d'antalgiques de type opioïde (morphine) par voie systémique.[184–186] Par exemple, l'administration d'une dose de bupivacaïne, soit directement dans la plaie soit lors d'un bloc nerveux périphérique, s'est avérée être une analgésie efficace pour le traitement de la douleur résultant d'un prélèvement osseux au niveau de la crête iliaque. Cette administration locale permet de réduire de 50 % la consommation de morphiniques sans aucun impact sur l'effet analgésique,[184] une découverte qui présente un intérêt majeur chez les patients âgés.

2.2.1. Mécanisme d'action

Les anesthésiques locaux sont des molécules couramment utilisées en médecine permettant de limiter la sensibilité locale sur un territoire donné par le biais d'une interruption de la conduction nerveuse. De manière générale, ces molécules sont utilisées dans le cadre d'anesthésie locale comme l'anesthésie de contact ou loco-régionale comme dans le cas d'une rachianesthésie.

Les anesthésiques locaux agissent en modifiant le potentiel d'action des cellules neuronales et en modulant ou parfois même en bloquant, la conduction de l'influx nerveux le long des neurones. L'influx nerveux provient des modifications du gradient électrique de part et d'autre de la membrane cellulaire des fibres nerveuses par l'intermédiaire des canaux sodiques. Au repos, il existe une différence de potentiel de l'ordre de -70 mV entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule provenant d'un environnement ionique différent (Figure 14 A). En effet, le milieu intracellulaire, chargé négativement, est constitué majoritairement de molécules organiques (notées A^-) chargées négativement et d'ions potassium alors que le milieu extracellulaire, lui chargé positivement, est riche en ions sodium, calcium et chlorure. Lors de la stimulation du neurone, cette différence de potentiel se trouve alors perturbée, c'est la phase de dépolarisation (Figure 14 B). Au cours de cette phase, le stimulus provoque une ouverture des canaux sodiques qui par la suite, laissent entrer massivement dans la cellule les ions sodium induisant un nouveau

potentiel intracellulaire de l'ordre de 30 mV. Sous l'influence de cette dépolarisation, les canaux potassiques s'activent et s'ouvrent à leur tour engendrant un courant potassique sortant dans le but de rétablir le potentiel membranaire initial. Cette phase de repolarisation s'accompagne d'une période réfractaire, pendant laquelle les canaux ioniques ne sont plus réceptifs aux stimuli. Il est donc impossible de générer un nouveau potentiel pendant ce laps de temps. Pour finir, alors que les ions sodium continuent d'être aspirés activement en dehors de la cellule par l'intermédiaire d'une pompe sodium/potassium, les ions potassium, quant à eux, vont rejoindre l'intérieur de la cellule. Le retard de ces ions pour rentrer dans la cellule engendre un phénomène d'hyperpolarisation qui au fur et à mesure s'estompe jusqu'à rétablir le potentiel de repos.

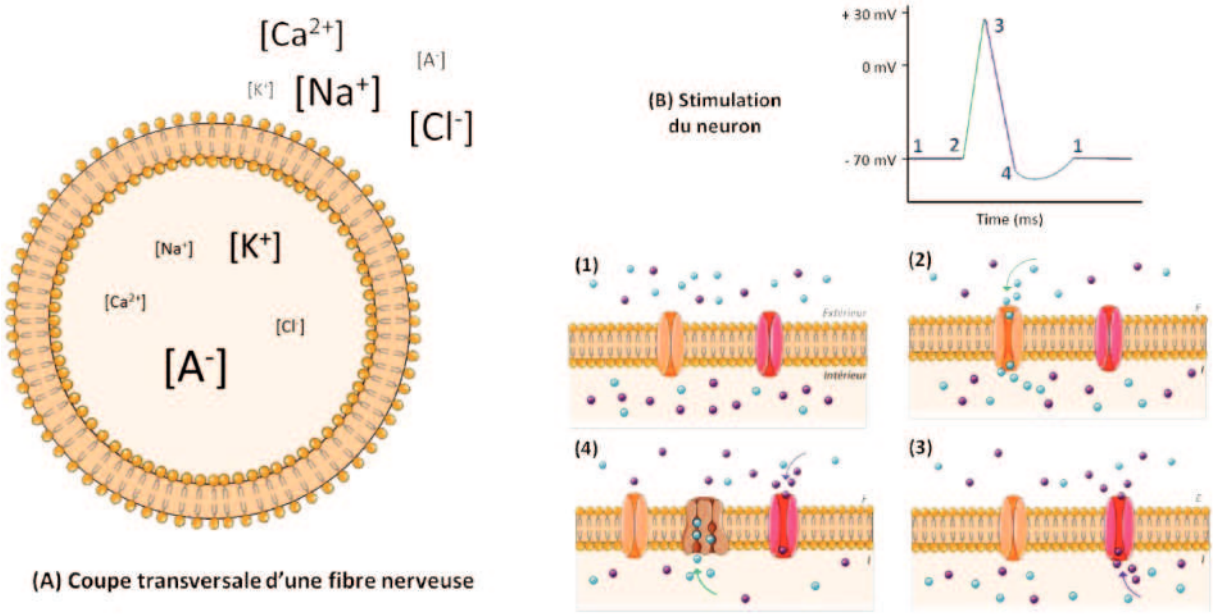


Figure 14 : *(A) Coupe transversale d'une fibre nerveuse et répartition ionique. (B)* Représentation de *l'influx nerveux avec (1) le potentiel de repos, (2) la phase de dépolarisation, (3) la phase de repolarisation et (4) la phase d'hyperpolarisation* avec les ions sodium (bleu) et les ions potassium (violet)

Les anesthésiques locaux passent au travers de la membrane de l'axone (riche en lipides) sous leur forme basique. Une fois à l'intérieur de la cellule, le pH étant plus acide (pH = 6,9), ces molécules sont ionisées afin de se fixer sur la partie intracellulaire des canaux sodiques membranaires. Ce blocage de la conduction survient lors de la phase de dépolarisation. Ainsi, au fur et à mesure de la propagation de l'action anesthésique le long du neurone, le temps de la conduction de l'influx nerveux s'allonge. La conduction peut également être complètement bloquée à partir d'une certaine concentration en anesthésique local. Sous cet effet, la partie anesthésiée peut perdre tout d'abord la sensibilité algique puis thermique et enfin tactile. Par

ailleurs, il est possible de moduler la concentration en anesthésiques locaux afin d'obtenir un blocage de la sensibilité thermo-algique sans bloquer la conduction des fibres nerveuses motrices. Néanmoins, toutes les fibres nerveuses ne sont pas sensibles à l'action analgésique de la même manière.

2.2.2. Structure des anesthésiques locaux

Les anesthésiques locaux possèdent tous une structure commune composée de trois éléments (Figure 15) :

- Un pôle lipophile de type aromatique qui conditionne la diffusion et la fixation,
- Une chaîne intermédiaire dont la longueur détermine la puissance et la toxicité,
- Un pôle hydrophile, dérivé amine, qui intervient dans la répartition sanguine et les capacités d'ionisation.

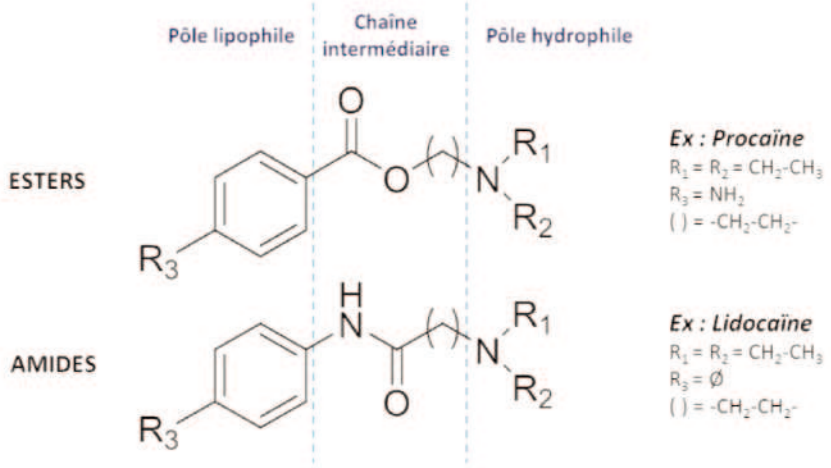


Figure 15 : Structure des anesthésiques locaux

Il est possible d'observer d'après la Figure 15 ci-dessus que les anesthésiques locaux se différencient en fonction de leur chaîne intermédiaire, soit du type ester (comme la procaïne) soit du type amide (comme la lidocaïne). L'allongement et la ramification de cette chaîne déterminent la liposolubilité, propriété qui sera explicitée ci-après. Toutefois, la liaison ester étant instable, les anesthésiques locaux de ce type sont dégradés rapidement par hydrolyse enzymatique alors que ceux possédant une liaison amide sont plus stables et subissent une dégradation hépatique plus lente ce qui leur confère une durée d'action plus longue. Ces raisons ont conduit à l'abandon des anesthésiques locaux de type ester en chirurgie orthopédique au profit de ceux de la famille des amino-amides.

Les propriétés physico-chimiques des anesthésiques locaux les plus importantes sont les suivantes :

- Le pKa,

  Ces molécules actives sont des bases faibles, dont le pKa varie de 7,6 pour la mépivacaïne à 8,9 pour la procaïne, ce qui détermine la proportion de forme non ionisée (diffusible) et de ionisée (active), au pH physiologique. Ce paramètre joue un rôle dans la vitesse d'installation de la molécule dans le bloc nerveux. De ce fait, plus le pKa de l'anesthésique local est proche du pH du milieu extracellulaire (pH = 7,4) et plus la molécule sera en proportion importante sous la forme non ionisée, ce qui va engendrer une quantité accrue d'anesthésique dans la cellule neuronale. Par exemple, la mépivacaïne dont le pKa est de 7,6 sera à 61 % sous la forme non ionisée dans le milieu extracellulaire. À l'inverse, la bupivacaïne qui possède un pKa plus haut (8,1) seulement 17 % de la molécule existera sous la forme basique (Figure 16). Ainsi, sa vitesse d'installation sera moins rapide dans la cellule neuronale mais sa durée d'action sera augmentée.

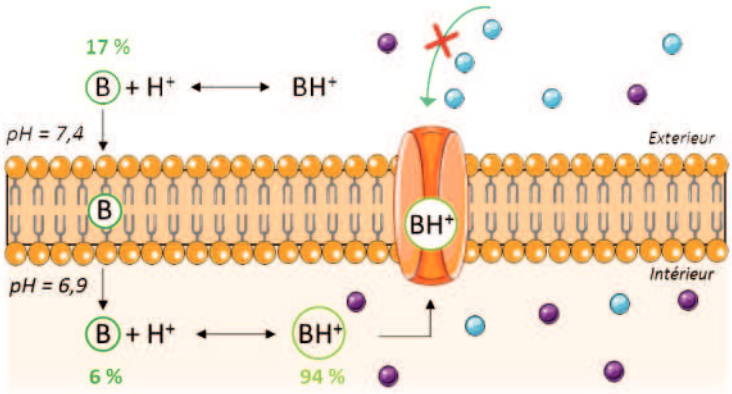


Figure 16 : Exemple du mode d'action de la bupivacaïne. Figure adaptée [187]

Ce paramètre intervient avec la lipophilie décrit ci-après.

- La lipophilie,

  La membrane neuronale étant très riche en lipides, la liposolubilité permet aux anesthésiques locaux de pénétrer plus facilement à l'intérieur de la cellule. Intimement lié au poids moléculaire, le passage transmembranaire de la molécule sera d'autant plus facile que la lipophilie sera élevée, ce qui influe également sur la puissance de la molécule. Plus cette dernière propriété est élevée et plus l'anesthésique local considéré sera puissant.

- L'affinité pour les protéines,

  Elle est responsable de la durée d'action du principe actif. Plus elle est élevée, plus la molécule reste attachée à ses récepteurs protéiques. Néanmoins, il est important de s'informer sur la vasoactivité d'une molécule puisque cette dernière conditionne également son temps d'action. Une molécule vasodilatatrice entraîne une augmentation du débit sanguin et donc amplifie son élimination. Par exemple, si on compare la lidocaïne (qui a un effet vasodilatateur) et la procaïne, cette dernière possède une durée d'action plus grande alors que son affinité pour les protéines est moindre.[188] De plus, il existe des mélanges associant un anesthésique local et une molécule vasoconstrictrice comme l'épinéphrine permettant à l'analgésique de rester plus longtemps sur le site d'action. En effet, l'épinéphrine engendre une diminution du diamètre artériel et limite ainsi la lixiviation du site douloureux par le flux sanguin.

La partie suivante sera consacrée essentiellement à la description des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de la bupivacaïne, de la levobupivacaïne et de la ropivacaïne, qui seront les molécules actives utilisées dans la partie expérimentale de ce travail.

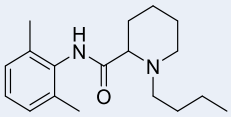
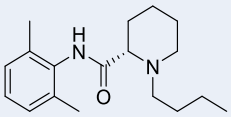
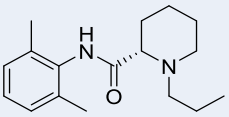
2.2.3. Anesthésiques locaux d'intérêts

La bupivacaïne, la levobupivacaïne et la ropivacaïne sont des anesthésiques locaux de la famille des amino-amides, essentiellement utilisés dans le cadre de la rachianesthésie (bupivacaïne), de l'anesthésie ou analgésie péridurale (ropivacaïne) et de l'anesthésie ou analgésie périnerveuse (levobupivacaïne et ropivacaïne).

Depuis plusieurs décennies, la bupivacaïne est l'anesthésique local à longue durée d'action le plus largement utilisé en médecine humaine. Cette molécule développée et commercialisée dans les années 60, a suscité un engouement majeur de par son action prolongée dans le temps[189] qu'elle possédait, comparé aux autres anesthésiques locaux existants à l'époque. Sa forte affinité pour les protéines et sa puissance analgésique élevée due à sa lipophilie élevée (Tableau 4), lui permet d'être administrée en faible dose pour atteindre une analgésie importante.[190] Malgré cela, cette molécule tend à être remplacée par des molécules possédant des effets indésirables moindres.[191] En effet, la bupivacaïne a causé de nombreux effets

secondaires dus à sa cardiotoxicité et sa vasoactivité. Toutefois, elle reste, à l'heure actuelle, incontournable pour la rachianesthésie.[192]

Tableau 4 : Caractéristiques physico-*chimiques des anesthésiques locaux d'intérêts*

	Bupivacaïne	**Levobupivacaïne**	**Ropivacaïne**
			
Formule brute	$C_{18}H_{28}N_2O$	$C_{18}H_{28}N_2O$	$C_{17}H_{26}N_2O$
pKa	8,1	8,1	8,1
Mw (g/mol)	288,4	288,4	274,4
Coefficient de partage	346	346	115
Liposolubilité	28	28	6,1
Fixation aux protéines plasmatiques FPP (%)	96	97	94
Puissance relative*	8	6 - 8	6
Délai d'action	intermédiaire	intermédiaire	intermédiaire
Durée d'action	3 h - 3 h 30	3 h - 3 h 30	3 h

*La procaïne étant la molécule de référence.

L'avantage des anesthésiques locaux de la famille des amino-amides est le fait que la plupart de ces principes actifs sont des molécules chirales. En effet, puisqu'elles possèdent un centre chiral, il est possible alors d'obtenir des stéréoisomères optiquement actifs. Ces derniers peuvent être différenciés par leur pouvoir rotatoire ; lorsque la rotation s'exerce dans le sens des aiguilles d'une montre, l'isomère est qualifié de dextrogyre alors que lorsque la rotation est dans le sens inverse, c'est l'isomère lévogyre. Bien qu'ils possèdent des propriétés physico-chimiques identiques, les stéréoisomères ont cependant des interactions significativement différentes avec les récepteurs biologiques, puisque leur configuration favorise les interactions avec une forme vis-à-vis de l'autre. Ainsi, il a été démontré que l'isomère lévogyre de la bupivacaïne possède une toxicité systémique moindre que l'isomère dextrogyre.[193] De ce fait, la levobupivacaïne et la ropivacaïne (forme lévogyre pure) ont été synthétisées et introduites dans la pratique clinique.

La bupivacaïne et la levobupivacaïne sont les mêmes molécules à l'exception que cette dernière est l'énantiomère lévogyre pur comparé à la bupivacaïne qui est un mélange racémique. Du fait de sa chiralité, cette molécule possède tous les avantages de la bupivacaïne avec des effets

indésirables (comme la cardiotoxicité) moindres. Néanmoins, la synthèse étant plus compliquée, le coût de sa production est par conséquent beaucoup plus élevé.
À la différence de la bupivacaïne, la ropivacaïne possède une chaîne propyle au niveau du pôle hydrophile (voir Tableau 4). Également grâce à sa chiralité sa toxicité systémique est diminuée et elle possède un effet vasodilatateur moins marqué, ce qui lui permet de persister davantage sur le site d'injection.[194] Cependant, cette différence structurelle entache son efficacité, en effet, possédant une chaîne alkyle plus courte, elle est alors moins lipophile et donc son efficacité est légèrement inférieure à la bupivacaïne tout en étant du même ordre de grandeur.

En plus de leur propriété analgésique, ces molécules ont des propriétés antibiotiques déjà décrites dans la littérature.[195–197] En outre, il apparaît que la chiralité ait un impact sur leur activité antimicrobienne.[195] Ce point fera l'objet d'une étude in vitro et les caractéristiques inhibitrices et bactéricides de ces anesthésiques locaux seront détaillées plus précisément pages 131-134.

3. Systèmes combinés de libération d'anesthésiques locaux

Dans le but de minimiser la douleur postopératoire et de réduire la consommation morphinique, l'un des défis majeurs est de concevoir une formulation composée d'anesthésique local pouvant être idéalement injectée en une seule fois pendant la chirurgie afin d'assurer un soulagement adéquat, continu et prolongé de la douleur. Dans cette optique, le développement de dispositif combiné à libération prolongée d'anesthésique local a été conçu pour demeurer sur le site d'injection et de libérer (avec une cinétique modulée) in situ le principe actif à des doses thérapeutiques sans endommager les tissus mous environnants. Ces systèmes utilisent des vecteurs de principes actifs biocompatibles divers qui peuvent (i) allonger l'effet analgésique et (ii) diminuer la concentration plasmatique maximale d'anesthésique local.[198] Cette dernière action permet l'administration de doses plus élevées en toute sécurité, ce qui prolonge la durée de l'analgésie.

Dans le cadre de cette étude, seules les matrices utilisables en chirurgie orthopédique et associées à nos anesthésiques locaux d'intérêts seront présentées ci-après (Figure 17) : les polymères, les liposomes, les cyclodextrines, les phosphates de calcium.

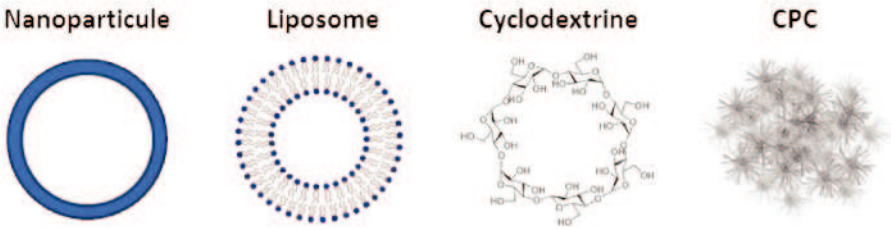


Figure 17 : Représentation schématique des différentes matrices, nanoparticule, liposome, β-cyclodextrine et CPC

Les matériaux polymères sont une grande famille de molécules naturelles (comme l'alginate (AG)) ou synthétiques (comme le polyéthylène (PE) ou le polypropylène (PP)) composées de plusieurs sous-unités monomères répétées. Les polymères sont largement utilisés dans le domaine biomédical en raison de leurs propriétés avancées et contrôlables pour répondre aux exigences au niveau des aspects physiques, chimiques, biologiques, biomécaniques. L'avantage de ces biomatériaux résulte dans la possibilité de les préparer sous différentes formes physiques telles que des particules (sphères ou capsules), des hydrogels, sous forme de membrane ou de film. Ainsi, plusieurs auteurs ont démontré, grâce à l'association de polymères avec la bupivacaïne, une efficacité analgésique plus longue vis-à-vis d'une dose injectée par voie systémique (3 h – 3 h 30).[199,200] Par exemple, il a été démontré que l'administration de nanoparticules d'AG contenant 0,5 % de bupivacaïne prolonge significativement sa libération jusqu'à 13 h.[200] Il en est de même pour des nanoparticules chargées en ropivacaïne dont l'effet analgésique a été étudié sur un modèle de douleur postopératoire chez le rat.[201] Ce système a permis d'augmenter la durée du blocage du nerf sciatique plus de 3 jours en seulement une administration alors que l'injection systémique de ropivacaïne n'était efficace que pendant 8 h.

Les liposomes, découverts dans les années 1960,[202] sont des particules sphériques microscopiques artificiellement formées à partir d'une bicouche lipidique renfermant un compartiment aqueux. En raison de leur structure, les liposomes sont des véhicules idéaux pour le transport de diverses substances biologiquement actives vers leur site d'action. De plus, ces systèmes ont la possibilité d'englober à la fois des molécules hydrophiles (au centre) et des molécules hydrophobes (dans les bicouches lipidiques). En 2011, une formulation liposomale contenant 13,3 $mg.mL^{-1}$ de bupivacaïne (Exparel®) a été approuvée par la FDA américaine pour l'analgésie post-chirurgicale.[203] Il a été montré qu'à la suite d'une injection de cette formulation dans le grand trochanter d'un rat, que le blocage du nerf sciatique a duré 240 min comparativement à 120 min et 210 min pour des solutions de chlorhydrate de bupivacaïne à

5 $mg.mL^{-1}$ et 13,3 $mg.mL^{-1}$ respectivement.[204] Néanmoins, actuellement aucun article n'a comparé une formulation liposomale chargée en bupivacaïne et un mélange varié d'analgésiques non opioïdes. Compte tenu des effets attendus sur le soulagement de la douleur, la consommation d'opioïdes et la durée du séjour hospitalier, ce dispositif combiné n'a montré aucune différence significative sur ces paramètres comparé à un cocktail analgésique standard.[198]

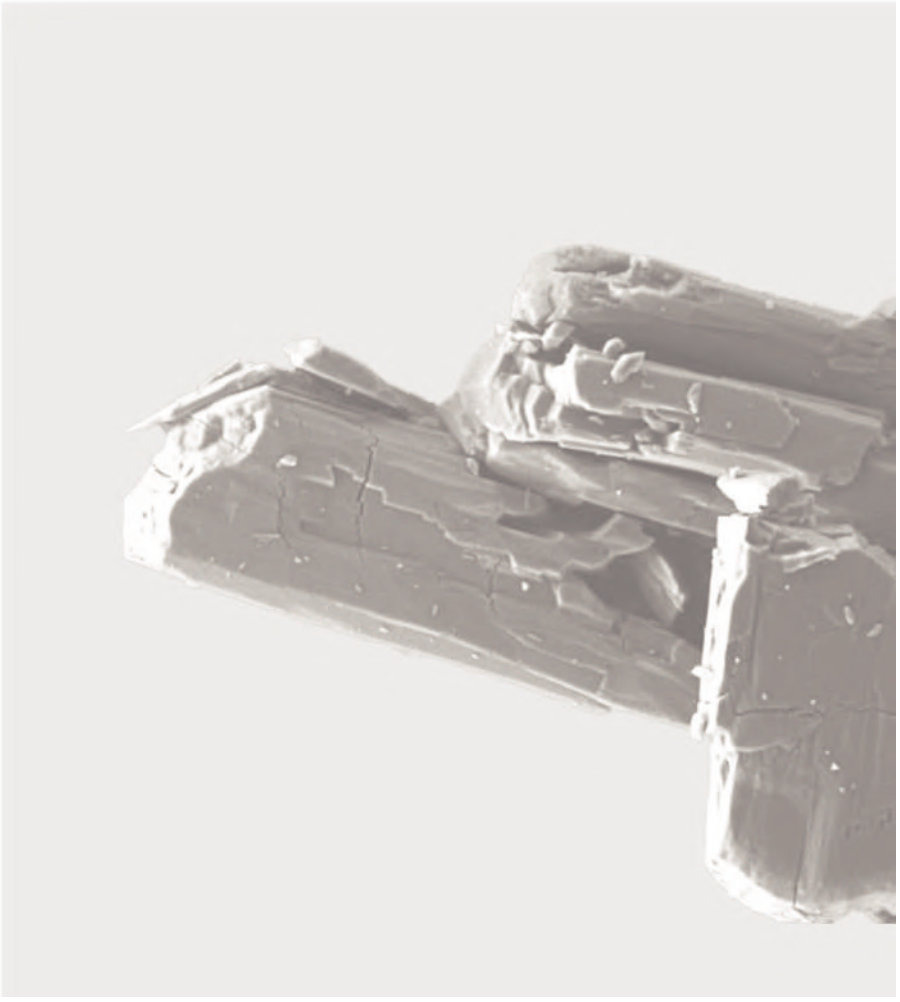
Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques constitués d'au minimum six unités de D-glucopyranose ($C_6H_{10}O_5$) liées en α-1,4. Ces molécules cages sont capables d'encapsuler divers agents thérapeutiques grâce à leur structure interne composée d'une cavité centrale lipophile et d'une surface externe hydrophile.[205] Parmi ces composés, les cyclodextrines les plus utilisées sont : l'α-CD, la β-CD et la γ-CD possédant respectivement 6, 7 et 8 unités $C_6H_{10}O_5$. La plupart des anesthésiques locaux disponibles dans le commerce possèdent un cycle benzénique qui peut être pris en charge par la β-CD, l'une des trois formes de CD les plus abondantes. D'après la littérature,[206–208] des complexes d'inclusion ont été formés entre les CD et nos agents analgésiques d'intérêts améliorant ainsi leur solubilité, leur stabilité physico-chimique et leurs propriétés pharmacodynamiques. Plusieurs formulations ont été testées sur des modèles de rongeurs. Par exemple, un complexe chargé en levobupivacaïne a été évalué des modèles de blocs nerveux intrathécal et sciatique chez le rat[209] et a permis de montrer une prolongation de l'analgésie sans induire de signes neurologiques sévères. En effet, l'analgésie induite de cette formulation s'est avérée deux fois plus longue que celle avec la molécule active seule, la concentration de levobupivacaïne étant de 0,5 % dans les deux cas. Dans un autre cas, l'efficacité de cyclodextrines chargées en bupivacaïne a été testée sur l'anesthésie dentaire après blocage du nerf alvéolaire inférieur chez le rat.[206] L'anesthésie pulpaire a été évaluée en appliquant une stimulation électrique sur les molaires inférieures. Le complexe a montré des propriétés anesthésiques similaires à celles d'une combinaison de bupivacaïne et d'épinéphrine, ce qui pourrait ainsi constituer une alternative pour une utilisation clinique future en dentisterie. Un système similaire basé sur un complexe chargé en ropivacaïne a également démontré un effet antalgique sur un modèle de bloc sciatique chez la souris.[208] Dans ce contexte d'amélioration de l'effet antalgique par la modulation de la cinétique de libération, des approches de combinaison ont été formulées comme par exemple des systèmes à base de cyclodextrines et de liposomes.

Les substituts osseux composés de phosphate de calcium, en particulier les ciments phosphocalciques, sont maintenant considérés comme le traitement de référence[4] pour de nombreuses indications de chirurgie orthopédique avec comblement osseux. Ils sont résorbables par les cellules osseuses, présentent des propriétés ostéoconductrices[4,210–213] et peuvent être associés à des molécules bioactives et à des agents thérapeutiques agissant alors comme des systèmes d'administration de médicaments locaux.[214,215] L'association de ce type de biomatériaux avec une molécule anesthésique a déjà été validée en alliant des granules de PCa et de la bupivacaïne. Les propriétés analgésiques in vivo du dispositif combiné ont démontré un effet analgésique dose-dépendant significatif sur un modèle de douleur postopératoire chez le rat en utilisant une évaluation par l'algométrie de pression.[147] Des CPCs contenant de la lidocaïne ont également été mis au point.[148] Les essais de libération ont montré une libération « flash » du PA pendant les 6 premières heures suivit d'une cinétique plus lente jusqu'à 6 j où 100 % de la lidocaïne a été libérée. Récemment, des sels de bupivacaïne et de levobupivacaïne ont été incorporés dans la phase solide d'un ciment composé d'α-TCP et d'un ciment composé d'un mélange d'α-TCP et d'acrylamide.[216] Ces derniers ont libéré environ 60 % des principes actifs après 144 h d'incubation.

Les CPCs étant maintenant reconnus comme le traitement de choix pour de nombreuses indications orthopédiques et traumatiques,[52,217] le but de cette étude est de concevoir un biomatériau injectable innovant combinant à la fois un ciment phosphocalcique et différents anesthésiques locaux pour des indications orthopédiques ou de traumatismes osseux.

Le travail de recherche présenté dans ce chapitre s'articule autour de deux parties.
La première partie est dédiée (i) à la formulation d'un ciment apatitique combiné avec des anesthésiques locaux, le but étant d'obtenir des propriétés physico-chimiques adéquates en vue d'une implantation chez l'animal (ii) à l'étude de la forme sous laquelle les molécules actives se trouvent après l'association et (iii) à l'étude in vitro de la cinétique de libération des anesthésiques locaux.
La seconde partie porte sur (i) l'évaluation antalgique de ces dispositifs médicaux sur la douleur postopératoire après une chirurgie osseuse, l'effet anesthésique sera étudié grâce à une analyse fonctionnelle de la marche avec le système Catwalk (ii) l'observation de l'impact des CPCs sur les propriétés biologiques et (iii) l'étude préliminaire de l'activité antibactérienne des ciments chargés combinés.

Partie A : Formulation et caractérisations physico-*chimiques d'un ciment PCa* chargé en anesthésiques locaux



1. Formulation de CPCs combinés avec des anesthésiques locaux

1.1. Protocole expérimental

Les différentes formulations ont été préparées à partir d'un ciment apatitique commercial (QuickSet : GQS, Graftys SA, Aix-en-Provence, France), principalement constitué de phosphate tricalcique (α-TCP; 78 %). Les anesthésiques locaux, à savoir la bupivacaïne (Fluka), la ropivacaïne (SAFC) et la levobupivacaïne (lot 1, SAFC et lot 2, Fluorochem), sont directement ajoutés sous forme de poudre à la phase solide du ciment à 8 % en masse (w/w). Les mélanges sont, par la suite, placés dans un agitateur tridimensionnel (Inversa Tumbler Mixer, BioENGINEERING) pendant 1 h à une vitesse de 50 tr/min. Cette étape permet d'homogénéiser nos préparations. Une fois ceci réalisée, la pâte de ciment est préparée en gâchant la poudre avec une solution aqueuse à 0,5 % Na_2HPO_4, qui joue le rôle de durcisseur, avec un certain ratio liquide sur poudre (L/P). Ce dernier est adapté dans le but d'obtenir une préparation injectable utilisable en chirurgie osseuse.

Dès lors que les molécules actives sont incorporées dans le ciment, les CPCs sont référencés selon les dénominations suivantes :

- CPC pour le ciment contrôle,
- Ansth-CPCs pour les formulations des ciments combinés en anesthésique local,
- Bupi-CPC pour la formulation de ciment combiné avec de la bupivacaïne,
- Levo-CPC pour la formulation de ciment combiné avec de la levobupivacaïne,
- Ropi-CPC pour la formulation de ciment combiné avec de la ropivacaïne.

2. Étude des propriétés physico-chimiques de CPCs chargés en anesthésiques locaux

2.1. Matériels et Méthodes

2.1.1. Diffraction des rayons X sur poudre (pDRX)

Les différents diffractogrammes des poudres de ciment ont été enregistrés après une prise de 72 h à 37 °C dans une solution saline à 0,9 % en poids de NaCl. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre D8 Advance (géométrie de type Bragg-Brentano en mode theta/2theta), équipé d'un tube muni d'une anode en cuivre. Le diffractomètre possède un monochromateur avant permettant ainsi la sélection de la radiation Cu $K\alpha_1$ (λ = 0,1540593 nm). Le détecteur rapide de type silicium à bande collecte les rayons X simultanément avec une

gamme angulaire exploitable de 0,5 à 150° 2θ. Les mesures ont été réalisées avec les conditions suivantes : tube RX à 40 kV de tension et 40 mA de courant, 1 h par diagramme en allant de 5° 2θ à 60° 2θ avec un pas de 0,0105° 2θ.

2.1.2. Spectrométrie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres IR ont été enregistrés à partir d'un spectromètre IRTF (Bruker Vertex 70). Les mesures des différentes formulations de CPCs ont été réalisées à partir de pastilles de KBr avec un ratio de 100 mg de KBr anhydre pour 1 mg d'échantillon. Chaque acquisition a été enregistrée, sous atmosphère sèche et purifiée, dans un domaine spectral allant de 4000 à 400 cm^{-1} avec un nombre de 128 scans.

2.1.3. Résonance magnétique nucléaire du solide

Toutes les expériences RMN ont été effectuées après avoir stoppé le processus d'hydratation du ciment en mettant les échantillons dans une étuve sèche à 37 °C pendant 1 semaine.
Les expériences RMN MAS ^{31}P ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker Avance II. Son champ magnétique est de 7,0 T et correspond à des fréquences de Lamor de 300 et 121,5 MHz pour ^{1}H et ^{31}P respectivement. Une sonde de double résonance de 4 mm et une fréquence de rotation de 12 kHz ont été utilisées. Pour toutes les expériences, un découplage ^{1}H SPINAL-64[218] avec une fréquence de nutation de 70 kHz a été appliqué pendant l'acquisition du signal. Les spectres MAS quantitatifs ^{31}P ont été enregistrés en utilisant un angle de basculement de 24° (longueur d'impulsion de 1 µs) et 64 scans ont été accumulés avec un temps de recyclage de 60 s assurant une relaxation complète de l'aimantation. Les spectres RMN $\{^{1}H\}$-^{31}P- CP MAS ont été acquis en utilisant un temps de contact de 1 ms ; 1024 scans ont été accumulés en utilisant un temps de recyclage de 1 s. Les déplacements chimiques ^{31}P ont été référencés par rapport à H_3PO_4 85 %. Afin de suivre ex situ la transformation progressive de l'α-TCP en CDA, les spectres quantitatifs ^{31}P MAS ont été déconvolués avec le programme Dmfit en utilisant quatre contributions indépendantes, dont deux correspondent aux spectres expérimentaux ^{31}P de l'α-TCP et du DCPA, et le restant étant une lorentzienne centrée à 3,05 ppm caractéristique de la phase CDA. La quantité relative (en % en poids) de chaque phase en fonction du temps de prise a été déterminée en supposant que la composition de la phase CDA formée était proche de $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$.

2.1.4. Temps de prise

Les temps de prise sont déterminés en utilisant une méthode normée : la méthode des aiguilles de Gillmore (ASTM C266-08). Cette méthode permet d'estimer visuellement la vitesse de prise du ciment. Le dispositif est constitué de deux aiguilles, la première permettant de mesurer le temps de prise initial noté t_i (diamètre : 2,12 mm, poids : 113,4 g) et la seconde, le temps de prise final noté t_f (diamètre : 1,06 mm, poids : 453,6 g). Concrètement la pâte de ciment est placée dans une cellule (forme cylindrique, diamètre interne : 20 mm, profondeur : 4,7 mm) thermostatée à 37 °C. Par la suite, la mesure est réalisée en posant l'aiguille délicatement sur la surface du ciment. Cette dernière est alors soumise à la pression de l'aiguille (0,3 MPa pour le t_i et 5 MPa pour le t_f) qui laisse des traces d'indentation en début de réaction et qui s'amenuisent au cours du temps. La mesure est retenue lorsque les empreintes ne sont plus visibles. Dans la suite de ces travaux, seul le t_i sera pris en considération.

2.1.5. Propriétés d'extrusion

L'injectabilité est mesurée à l'aide d'un analyseur de texture Advanced Material Testing System (AmetekLS55kN/1124 lbf) équipé d'un support pour seringue. Le test consiste à mesurer la force nécessaire à extruder la pâte de ciment d'une seringue. Concrètement, après avoir mélangé les phases solide et liquide du ciment pendant 30 sec, la pâte est transférée dans une seringue avec un temps de remplissage d'environ 1 min 30. Pour ces essais, les seringues utilisées sont des seringues Terumo® de 2,5 mL, sortie en double biseau, la surface intérieure est de 64 mm² et la section de sortie est de 1,6 mm soit 16 G. Ensuite, la seringue est mise sur le support et la mesure de l'injectabilité est lancée à 3 min après le début du mélange. Ce temps choisi pour l'injectabilité est le temps minimal pour réaliser toutes les étapes précédemment décrites, de plus il est, par ailleurs, conforme aux recommandations de l'industriel qui préconise d'injecter le ciment à 2 min post-gâchage. La vitesse de déplacement imposée au piston pour l'extrusion est de 1 $mm.sec^{-1}$. À la fin de la mesure, l'aspect de la pâte extrudée est contrôlé visuellement dans le but de s'assurer que la mesure n'est pas due à un phénomène de démixtion. Trois essais ont été réalisés pour chaque composition de ciment étudié. Le pourcentage de pâte extrudée pour chaque essai a aussi été calculé grâce à la pesée de la seringue avant remplissage, après remplissage et à la fin de l'extrusion de la pâte de ciment.

Afin de compléter cette étude, la travaillabilité des ciments a été étudiée à partir de mesures successives d'extrusion à différents temps. Concrètement, des mesures d'injectabilité ont été réalisées à 3, 5 et 8 min suivant le protocole précédemment décrit. Ces expériences permettent

la comparaison avec la vitesse de prise et apportent des informations sur le temps durant lequel le produit peut être travaillé et injecté. Pour une raison de coût seul le Bupi-CPC sera étudié.

2.1.6. Résistance à la compression

Les mesures de la force de compression sont mesurées grâce à un analyseur de texture Advanced Material Testing System (AmetekLS55kN/1124 lbf). Cet appareil permet de mesurer la déformation du matériau en fonction de l'effort de compression. Les essais consistent à soumettre un cylindre de ciment à une force axiale en le plaçant sur une plateforme située sous un piston plat, lui-même fixé à la cellule de mesure.

Pour ce faire, les cylindres de ciment sont préparés à l'aide de moules en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de diamètre interne : 6 mm et de hauteur : 12 mm. Après 30 min de séchage à température ambiante, les moules sont immergés dans une solution isotonique en NaCl (soit 9 % de NaCl en masse) pendant 72 h dans le but de mimer la prise du ciment dans un milieu biologique. Une fois pris, le cylindre est déposé au centre de la plateforme. Une vitesse de 1 $mm.s^{-1}$ est ensuite imposée au piston sur une distance de 6 mm. La résistance à la compression est ensuite calculée à partir de la force maximale mesurée d'après l'équation suivante :

$$\sigma = \frac{F_{max}}{Aire} = \frac{F_{max}}{\pi \times r^2}$$

2.1.7. Porosité

La porosité de chaque formulation a été calculée à partir d'éprouvettes de ciments préparés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.1.6. Une fois les cylindres pris, ces derniers sont pesés et mesurés.

Les mesures de densité sont, par la suite, déterminées par pycnométrie hélium. L'appareillage utilisé est un pycnomètre à hélium AccuPyc II 1340 Micromeritics (n°série SN1157) possédant une cellule de mesure de 1 cm^3 (notée V_{cell}) et d'une bille de calibration dont le volume théorique est V_{th} = 0,718502 cm^3. Cette dernière permet de calibrer l'appareil afin de vérifier la réponse de l'appareil avant toute analyse. En pratique, le volume de cette bille est mesuré et noté V_{exp}. Ainsi, l'appareil est considéré comme bien calibré lorsque :

$$V_{th} - \sigma_{acc} \leq V_{exp} \leq V_{th} + \sigma_{acc} \quad \text{avec } \sigma_{acc} = (V_{cell}*0{,}0003) + (V_{th}*0{,}0003)$$

Soit : $0{,}7180 \leq V_{exp} \leq 0{,}7190$ cm^3

L'échantillon est, par la suite, découpé au cutter dans le sens de la hauteur afin que celle-ci soit inférieure à 12 mm. Une fois l'échantillon inséré dans la cellule de mesure, l'acquisition est lancée. Celle-ci débute par une dizaine de purges successive où P_{purge} = 19,5 psig, puis les mesures sont réalisées avec les conditions suivantes : N ≤ 99, $P_{remplissage}$ = 19,5 psig et un taux d'équilibre = 0,0080 psig.min^{-1}. La mesure est considérée comme correcte lorsque σ ≤ 0,01 % sur les 5 dernières mesures. Ainsi, la porosité de chaque échantillon peut être déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Porosité (\%)} = \left(1 - \frac{m/V_{ech}}{\rho_{vrai}}\right) * 100$$

Avec m, la masse pesée de l'échantillon, V_{ech}, le volume calculé de l'échantillon et ρ_{vrai}, la densité mesurée par pycnométrie hélium.

2.1.8. Microscopie électronique à balayage

Les échantillons observés en microscopie ont été préparés soit à partir d'une fracture d'un cylindre d'un ciment à l'aide d'un cutter soit à partir d'une technique de préparation spécifique au crosspolisher. Ce dernier est une méthode de préparation qui permet d'abraser la surface du matériau grâce à un faisceau d'argon ionisé permettant ainsi d'obtenir une surface plane. Ainsi, les sections transversales ont été réalisées à l'aide d'un JEOL cross section polisher SM09010. Cette préparation d'échantillon a été réalisée sur 1 mm² grâce à l'utilisation d'un faisceau d'argon ionisé dont la tension est supérieure à 6 kV. Ce faisceau est utilisé perpendiculairement à l'échantillon pendant 6 h.

Chaque échantillon a ensuite été métallisé par une fine couche d'or-palladium. Les images MEB ont été observées à l'aide d'un microscope Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (Jeol 7600F) et ont été enregistrées en mode rétrodiffusé avec un courant d'électron de 9 pA et une tension entre 7 et 10 kV.

2.2. Résultats

Cette partie vise à étudier les caractéristiques finales des ciments combinés avec des anesthésiques locaux comme : la nature du produit obtenu, la cristallinité ou encore la porosité, ainsi que les différentes propriétés mises en jeu lors de la réaction de prise. Les échantillons de ciments combinés utilisés dans le cadre de cette étude sont référencés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Résumé des différents échantillons utilisés

Nature du produit obtenu après prise				
Nom	**Ciment**	**Principe actif**	**Conditions de prise**	**Analyses**
CPC	GQS	/	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	pDRX*, IRTF*, RMN ^{31}P*
Bupi-CPC	GQS	Bupivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Levo-CPC	GQS	Levobupivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Ropi-CPC	GQS	Ropivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Propriétés texturales				
CPC	GQS	/	/	Ti Injectabilité Travaillabilité Cohésion
Bupi-CPC	GQS	Bupivacaïne, 8 % w:w	/	
Levo-CPC	GQS	Levobupivacaïne, 8 % w:w	/	
Ropi-CPC	GQS	Ropivacaïne, 8 % w:w	/	
Propriétés structurales				
CPC	GQS	/	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	Résistance mécanique Pycnométrie* MEB*
Bupi-CPC	GQS	Bupivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Levo-CPC	GQS	Levobupivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Ropi-CPC	GQS	Ropivacaïne, 8 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	

* *arrêt du processus d'hydratation en plaçant les échantillons dans une étuve à 37* °C pendant 1 semaine

2.2.1. Nature du produit obtenu après prise

Dans le but de caractériser la nature du produit obtenu, chaque formulation de ciment a été successivement étudiée par diffraction des rayons X, par infrarouge et par RMN ^{31}P du solide. Les résultats pour les ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline seront présentés pour chacune des méthodes. De plus, le processus d'hydratation de tous les échantillons a été stoppé en les plaçant dans une étuve à 37 °C pendant 1 semaine.

La diffraction des rayons X sur poudre permet d'analyser les produits cristallisés, par conséquent, si l'un des produits de nos formulations est amorphe, il ne sera pas détectable par cette méthode. Sur les différents diffractogrammes (Figure 18), les raies représentatives de l'apatite sont observées, prouvant que la réaction d'hydrolyse à bien eu lieu. Les raies des produits de départ : l'α-TCP et le DCPA, sont également observées indiquant que la transformation n'est pas totale. De plus, quel que soit l'anesthésique local ajouté dans la formulation, les diffractogrammes sont semblables. L'association de ces molécules actives ne semble donc pas altérer la réaction de prise du ciment.

L'analyse par spectrométrie IR (Figure 19) permet de confirmer la présence de CDA pour le ciment contrôle ainsi que pour les ciments combinés (et ce quel que soit l'analgésique ajouté). Il est alors possible d'observer les larges bandes représentatives de l'eau entre 3500 - 3000 cm^{-1} et 1700 - 1600 cm^{-1}. Les bandes d'absorption intenses représentent les vibrations des groupements PO_4^{3-} sont situées entre 1200 - 950 cm^{-1} et 650 - 500 cm^{-1}. De plus, il est également possible d'observer les vibrations des groupements HPO_4^{2-} de l'apatite par l'intermédiaire de bandes de faible intensité entre 900 - 800 cm^{-1}. Pour finir, le groupement hydroxyle de l'hydroxyapatite est observé à 3570 cm^{-1}.

On constate également, sur chaque spectre IR contenant un antalgique la présence de bandes de vibration caractéristiques du PA. Ces bandes sont observées entre 3000 - 2800 cm^{-1}, 1700 - 1100 cm^{-1} et 800 - 750 cm^{-1}. La localisation de ces bandes représente respectivement les vibrations de groupement alkyle, carbonyle et aromatique des molécules analgésiques. Ces emplacements sont en accord avec les spectres IR des molécules purs dont la description se fera plus tard dans cette thèse.

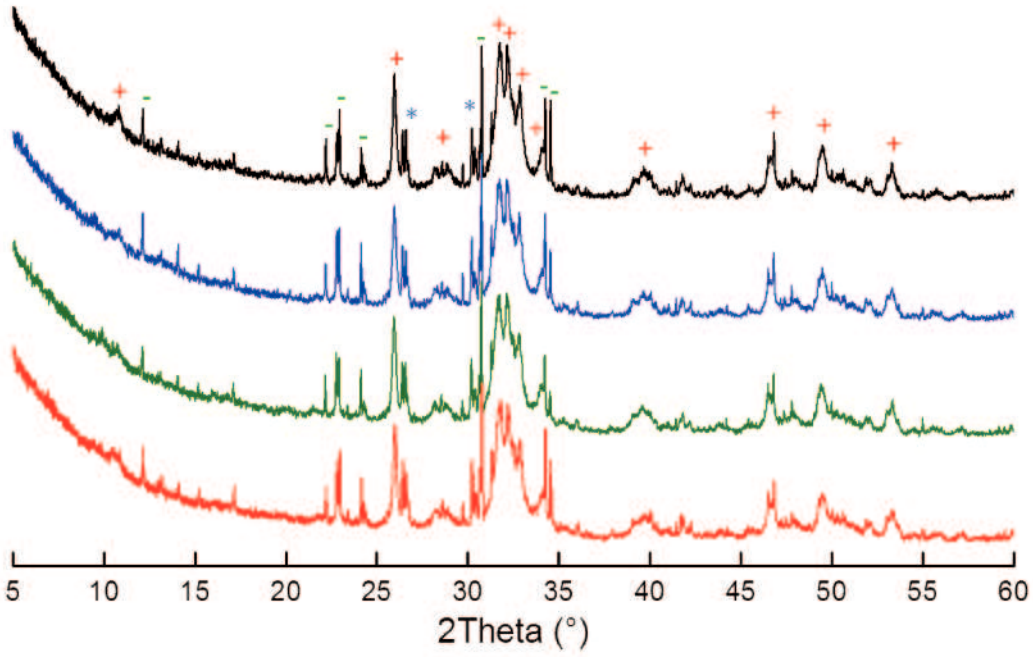


Figure 18 : Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert), le Ropi-CPC (rouge), + pic de *l'apatite*, - *pic de l'α*-TCP et * pic de la monétite

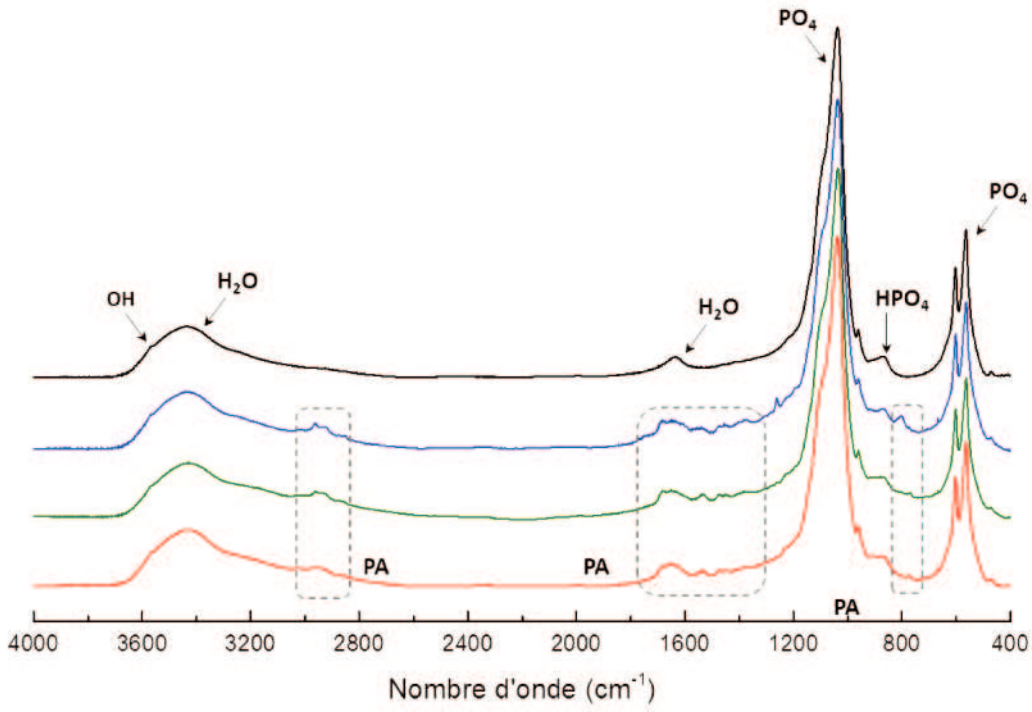


Figure 19 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert), le Ropi-CPC (rouge) et - - - zone de visualisation du PA

L'analyse par RMN ^{31}P à l'état solide permet d'observer et de quantifier la transformation d'α-TCP en CDA. En effet, l'avantage de la RMN du solide résulte du fait qu'elle permet d'analyser des composés qu'ils soient cristallisés ou amorphes permettant ainsi de donner la composition exacte de la phase minérale de nos différentes formulations de ciment à un instant t. Les spectres ^{31}P CP MAS de la Figure 20 A mettent clairement en évidence la présence de CDA (composé d'un pic à 3,1 ppm) et de DCPA (composé de 2 pics à -0,2 et -1,5 ppm). À cet instant, il est possible visuellement d'observer que l'ajout d'antalgique ne nuit pas à la formation de CDA. Par la suite, la déconvolution des spectres a été réalisée mettant en évidence chaque composé de la formulation possédant des noyaux phosphores (Figure 20 B). D'après la littérature,[23] cette simulation permet de déterminer la quantité relative de chaque phase. Ainsi, un pourcentage de CDA est obtenu de 68 % pour le CPC contrôle et de 66 %, 65 % et 60 % pour les ciments chargés en bupivacaïne, en levobupivacaïne et en ropivacaïne respectivement.

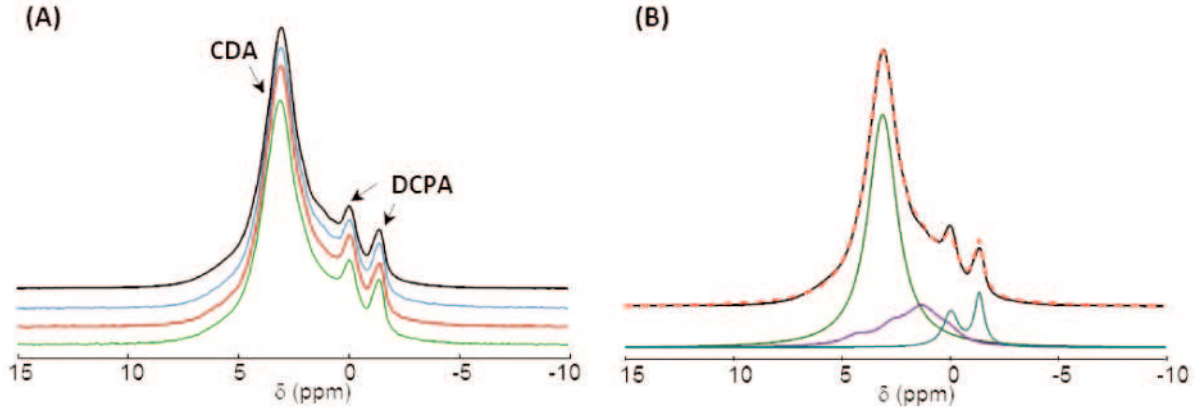


Figure 20 : (A) Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert)et le Ropi-CPC (rouge). (B) Déconvolution du spectre RMN MAS ^{31}P du CPC (rouge) avec la CDA (vert), *l'*α-TCP (violet) et le DCPA (bleu)

En accord avec les analyses IR et pDRX, les résultats de RMN démontrent que l'association de molécules analgésiques dans la phase solide du ciment n'interfère pas de façon significative à la transformation de l'α-TCP en CDA.

En conclusion, ces analyses ont permis de prouver que la réaction de prise n'a pas été entachée par l'association des antidouleurs avec le ciment et le produit majoritaire obtenu après prise est bien une CDA.

2.2.2. Influence des analgésiques sur les propriétés texturales du CPC

L'une des caractéristiques les plus importantes d'un biomatériau injectable et autodurcissable est la réaction de prise qui entraîne des modifications chimiques et physiques en un temps donné. Le chapitre I partie 2.2.3. a montré qu'il existait de nombreux paramètres pouvant influencer cette réaction comme notamment le temps de prise, l'injectabilité ou la cohésion. L'association de molécule active entraîne une modification de la composition globale des réactifs de départ du ciment. De ce fait, il est donc primordial de vérifier ces différents paramètres.

Lors de la préparation des ciments, aucune différence d'aspect n'a été observée tant au niveau du mélange que dans la texture finale (après les 30 sec de gâchage). Le Tableau 6 répertorie les propriétés texturales de chaque formulation de ciment. L'incorporation d'anesthésiques locaux dans le ciment n'a pas modifié significativement le temps de prise des différentes formulations. En effet, pour le Bupi-CPC et le Levo-CPC, les temps de prise ont légèrement été augmentés sans aucun changement au niveau du rapport L/P. En revanche, celui du Ropi-CPC est plus court (4 - 4,5 min). Le rapport L/P a alors été ajusté de 0,45 à 0,48 afin d'avoir un temps de prise similaire aux autres formulations de ciments. Le nouveau temps de prise de cette formulation est 6 - 6,5 min. Pour la suite des analyses, le rapport L/P du Ropi-CPC sera de 0,48.

Tableau 6 : Résumé des propriétés texturales des différentes formulations de ciment

	CPC	**Bupi-CPC**	**Levo-CPC**	**Ropi-CPC**	
L/P	0,45	0,45	0,45	0,45	0,48
t_i (min)	6,5	6,5 - 7	7 - 7,5	4 - 4,5	6 - 6,5
Injectabilité à 3 min (N)	5,3 ± 0,5	5,2 ± 0,2	5,6 ± 1,1	/	4,3 ± 1,1
Cohésion	Oui	Oui	Oui	/	Oui

L'injectabilité est la propriété essentielle des CPCs pour leur utilisation dans les opérations chirurgicales mini-invasives. En pratique, les ciments phosphocalciques sont injectés manuellement, il est donc essentiel de connaître la force nécessaire à appliquer pour extruder nos ciments d'une seringue. Il est important de noter que cette force ne doit pas dépasser 25 N (limite d'injectabilité manuelle). Cette limite a été établie spécialement pour tous les ciments Graftys avec le dispositif d'injection adéquat. Elle correspond à la force maximale applicable par le chirurgien pour injecter le produit avec un débit constant sans difficulté. Quelle que soit

la formulation du ciment l'injectabilité observée à 3 min est d'environ 5 N et n'est pas significativement différente entre les ciments. Pour le ciment chargé en ropivacaïne, la valeur légèrement plus basse d'injectabilité est seulement due au rapport L/P plus grand.

La travaillabilité a été étudiée avec un lot de ciment différent du lot utilisé pour l'analyse des autres propriétés texturales (Figure 21). L'injectabilité du ciment contrôle augmente au fur et à mesure du temps en cohérence avec le temps de prise de ce dernier (8 min). L'ajout de la bupivacaïne ne modifie pas l'injectabilité et ce quel que soit le temps d'extrusion.

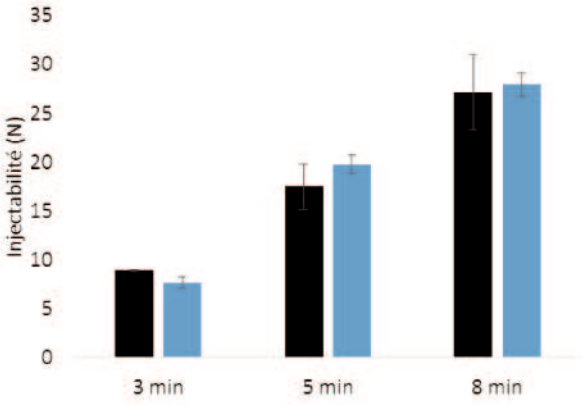


Figure 21 : Injectabilité du CPC (noir) et du Bupi-CPC (bleu) en fonction du temps (3, 5 et 8 min)

Afin de vérifier l'influence des anesthésiques locaux sur la cohésion des nouveaux ciments par rapport au contrôle, les échantillons de pâte de chaque formulation de ciment ont été injectés dans une solution saline et conservé à 37 °C pendant une semaine. La tenue des ciments a été analysée visuellement à deux instants : (i) immédiatement lorsque le ciment est rentré en contact avec la solution de NaCl et (ii) à long terme, après une semaine de prise. Toutes les formulations de ciments montrent une bonne tenue à court terme et à long terme, c'est-à-dire que la pâte est cohésive et qu'aucune particule visible n'est observée en solution. La Figure 22 ci-dessous est présentée à titre d'exemple.

Figure 22: Bupi-CPC après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C

En conclusion, l'association d'anesthésiques locaux ne modifie pas significativement les propriétés texturales du ciment contrôle non chargé.

2.2.3. Influence des analgésiques sur la structure du biomatériau

Les ciments phosphocalciques sont destinés à être implantés dans la matrice osseuse. Leur but primaire étant de soutenir mécaniquement la structure osseuse, il est donc nécessaire qu'ils aient une bonne résistance mécanique et que l'ajout de principe actif ne défavorise pas cette propriété. La résistance à la compression a donc été mesurée après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline (Figure 23 A). L'association des différentes molécules actives entraîne une diminution significative de la résistance à la compression de 25,5 ± 1,2 MPa pour le CPC contrôle à 18,4 ± 0,1 MPa pour le Bupi-CPC, 17,7 ± 0,8 MPa pour le Levo-CPC et de 16,3 ± 1,6 MPa pour le Ropi-CPC. Pour le dernier, la valeur trouvée est la conséquence directe d'un rapport L/P plus élevé. En effet, il a été démontré d'après la littérature[219] que ce paramètre est un facteur qui affecte la résistance finale du biomatériau par l'intermédiaire de la porosité. Par conséquent, l'augmentation de ce facteur induit une augmentation de la porosité (cf infra page 63) qui conclut à une diminution de la résistance mécanique. La Figure 23 B représente l'allure des courbes de la résistante en compression de chaque formulation de ciment. Une pente rapide est observée avec une rupture nette au sommet de la courbe, sans déformation. Ces courbes sont typiques de matériaux fragiles. Les différentes propriétés mécaniques des matériaux seront détaillées de manière plus approfondie dans le chapitre III, page 182.

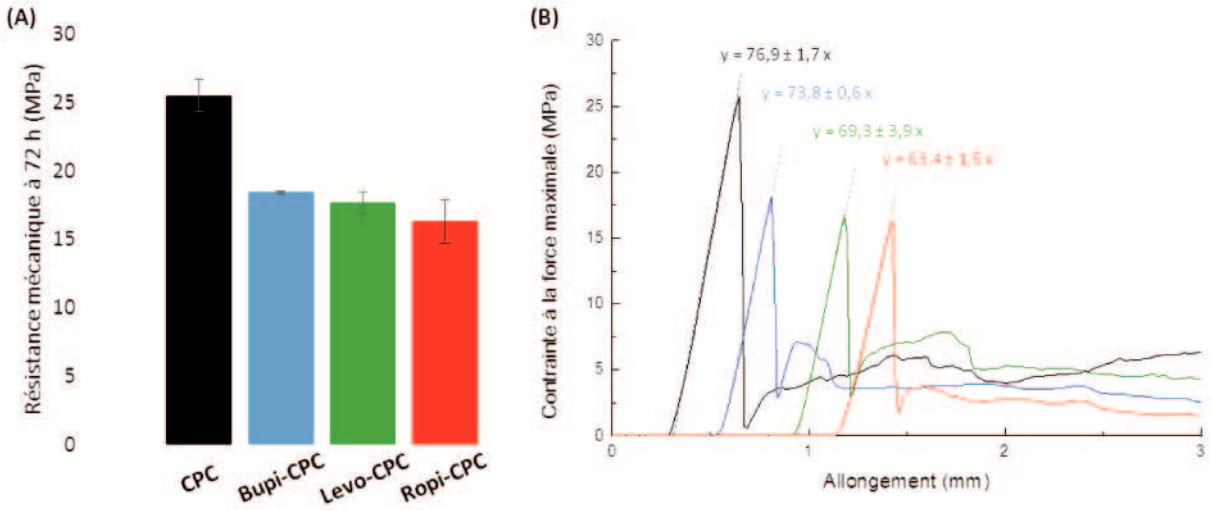


Figure 23 : Propriétés mécaniques des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec (A) la résistance à la compression des ciments et (B) les courbes de compression des ciments

La diminution de la résistance en compression peut être due à plusieurs facteurs comme une augmentation de la porosité, une interaction entre les PA et le CPC qui nuit à la cristallogénèse ou un emprisonnement des grains du PA qui favorise la création de fractures préférentielles au sein du ciment pris.

Afin de répondre aux questions sur les différences au niveau des propriétés mécaniques de nos ciments, nous avons analysé la densité des biomatériaux par pycnométrie hélium dans le but d'en déduire leur porosité respective. Les résultats sont référencés dans le Tableau 7 ci-dessous. Tout d'abord, une diminution de la densité vraie est observée des CPCs combinés due à la densité plus faible des analgésiques vis-à-vis de la CDA (ρCDA = 2,79 g.cm^3). Cette remarque est également valable entre les CPCs non chargés dont les rapports L/P sont différents. Dans ce cas l'augmentation du rapport L/P entraîne une augmentation de la porosité comme expliqué ci-dessus.[219] De plus, les anesthésiques locaux n'impactent que faiblement la porosité du ciment. Cependant, la pycnométrie hélium est une technique d'analyse permettant de définir une porosité globale, de ce fait il est impossible de connaître la répartition en taille des pores. Ce dernier paramètre ainsi que la forme et l'organisation des pores sont des facteurs pouvant modifier la résistance mécanique et sont analysables par porosimétrie mercure. Néanmoins, ces résultats laissent à penser que cette propriété ne permet pas d'expliquer la diminution de la résistance en compression des matériaux chargés en molécules actives.

Tableau 7 : Densité et porosité des différents CPCs après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline

	CPC	**Bupi-CPC**	**Levo-CPC**	**CPC**	**Ropi-CPC**
L/P	0,45	0,45	0,45	0,48	0,48
ρ_{vraie} (g/cm^3)	2,61	2,45	2,45	2,65	2,47
Porosité à 72h (%)	48,2	49,6 ± 1,7	48,7 ± 0,6	50,8	53,1 ± 0,8

La microstructure des CPCs provient d'une réaction chimique qui consiste (i) à la dissolution des produits de départ et (ii) à la précipitation d'un nouveau phosphate de calcium dont les cristaux formés s'enchevêtrent et engendrent la résistance mécanique du matériau. La microstructure de nos biomatériaux a été étudiée par MEB.

La Figure 24 présente la microstructure d'un ciment contrôle à faible grandissement (A) et à fort grandissement (B et C). À faible grandissement, il est possible d'observer une surface lisse contenant des bulles d'air. Ces dernières, sphériques et d'un diamètre variant de 30 à 100 nm,

ont été piégées lors de la prise du ciment. À plus fort grandissement, il est possible d'observer (i) l'enchevêtrement des cristaux et (ii) des « capsules » dont la morphologie évoque celle d'une géode avec une enveloppe assez dense et une partie interne garnie de cristaux plaquettaires interdigités. Cette formation suggère l'hydrolyse complète d'un grain d'α-TCP en CDA. La préparation d'échantillon avec le crosspolisher permet de créer une surface plane et d'observer avec précision cette microstructure.

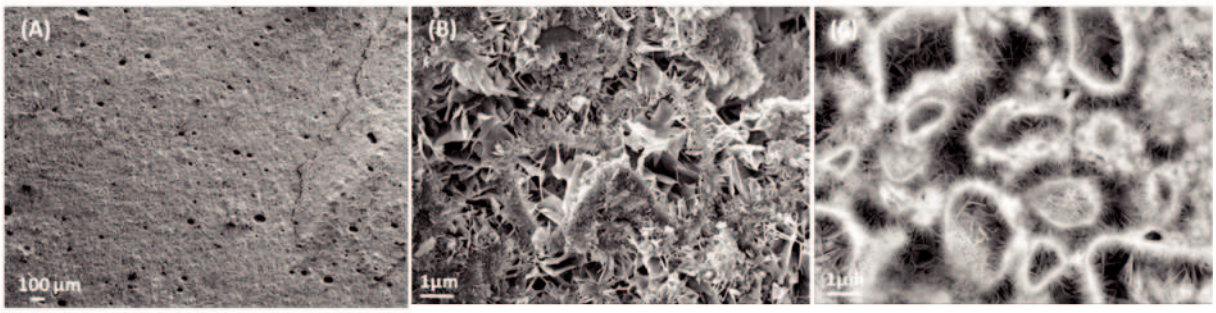


Figure 24 : Photographies MEB du ciment contrôle après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher.

Il est également possible dans cette formulation de ciment d'observer, avec un grandissement moins fort, quelques particules plus denses, qui selon la littérature[72] ont été assignées grâce à la mesure du rapport Ca/P par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX) à de l'α-TCP ou du DCPA.

La Figure 25 représente les photographies MEB des ciments combinés à différents grandissements. Hormis une porosité qui semble plus élevée dans le ciment chargé en bupivacaïne, aucune différence majeure n'est observée entre les formulations de ciments, à faible grandissement. De plus, nous savons par le biais de la pycnométrie que tous les ciments possèdent une porosité globale semblable. Par comparaison avec le ciment contrôle, la surface des ciments combinés ne lui est pas significativement différente (Figure 25 A).
Cependant à fort grandissement (Figure 25 B), il est possible d'observer des clichés MEB différents entre les CPCs chargés en molécule actives mais aussi ces ciments combinés et le ciment contrôle. En effet, alors que pour le ciment contrôle la formation de géodes de CDA ainsi que l'enchevêtrement des cristaux sont observables, pour les ciments chargés, il est impossible de distinguer ni la présence de ces géodes ni l'enchevêtrement des cristaux. Ce phénomène est d'autant plus marqué pour le ciment chargé en bupivacaïne. De ce fait, il est possible de se demander si l'incorporation d'antalgique nuit à la formation de CDA ou à la

cristallogenèse. Les analyses qualitatives pDRX et IR et quantitative RMN MAS ^{31}P ont montré que la formation de CDA n'était pas remise en cause par l'association du ciment phosphocalcique avec des antidouleurs. De plus, la RMN quantitative a permis de montrer que l'avancement de la formation de CDA était identique quelle que soit la formulation de ciment.

Grâce à la préparation des échantillons au crosspolisher (Figure 25 C), les clichés observés des CPCs chargés sont similaires au ciment contrôle c'est-à-dire qu'il est possible d'observer les géodes de CDA ainsi que l'enchevêtrement des cristaux d'apatite. Ceci peut laisser supposer qu'une couche d'anesthésique local recouvre les cristaux, ce qui empêche d'observer correctement l'enchevêtrement de ces derniers sur les clichés présentés par la Figure 25 B. Ainsi, l'ajout de ces principes actifs ne nuit pas à la formation de la cristallinité des ciments chargés. La diminution de la résistance en compression de nos matériaux est donc exclusivement due à la formation de ruptures préférentielles.

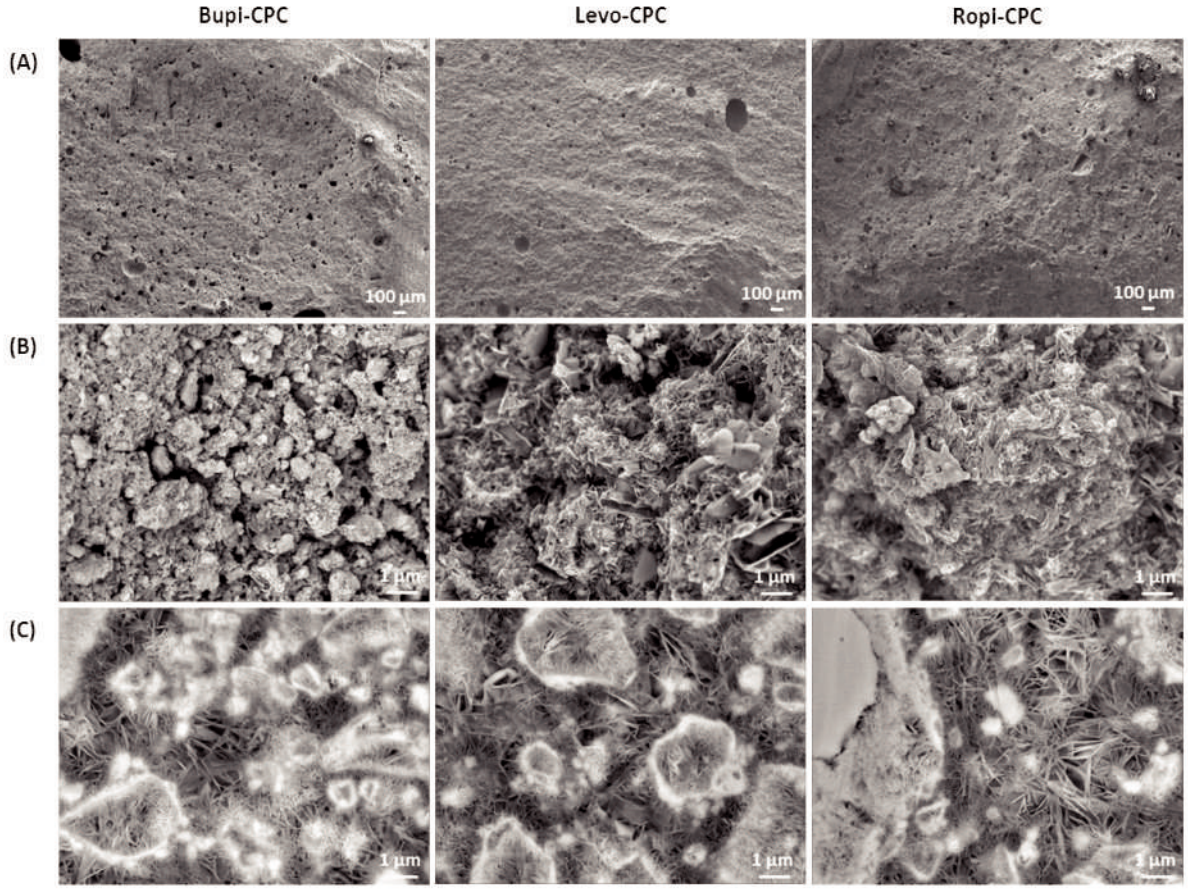


Figure 25 : Photographies MEB des ciments chargés en anesthésiques locaux après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher.

En conclusion, l'ajout d'anesthésiques locaux comme la bupivacaïne, la ropivacaïne et la levobupivacaïne ne modifie pas de manière drastique les propriétés usuelles du ciment commercial. En effet, les propriétés texturales, certaines des propriétés structurales et le produit final ne sont pas altérés par cet ajout. Seule la résistance mécanique, par le biais de fracture préférentielle qu'engendrent les grains du PA, est modifiée.

3. Intégrité des principes actifs au sein du ciment

Le premier chapitre évoquait un point important concernant (i) la distribution du principe actif et (ii) la forme sous laquelle il réside dans la matrice. Les anesthésiques locaux ont été intégrés dans les réactifs solides de départ par le biais d'un mélange de poudre. Par conséquent, après la phase de gâchage du ciment, ces molécules actives se trouveront, selon leur solubilité dans le liquide durcisseur, partiellement dissoutes dans la matrice inorganique.

3.1. L'association nuit-elle à l'intégrité des principes actifs ?

Afin de déterminer la forme sous laquelle les antidouleurs se trouvent dans la matrice, des clichés MEB ont été réalisés avant et après introduction dans le biomatériau.

On observe tout d'abord sur la Figure 26 A, B que les trois analgésiques ont des morphologies différentes. La bupivacaïne se présente sous la forme de bâtonnets avec une taille plutôt homogène de 100 µm de longueur. Concernant la levobupivacaïne, il est possible de remarquer une inhomogénéité autant au niveau de la forme que de la taille c'est-à-dire que l'échantillon présente soit des petits blocs d'une trentaine de µm ou soit des blocs plus imposants d'environ 200 µm. La ropivacaïne est composée de gros blocs d'une taille allant de 150 à 200 µm.

Les CPCs chargés en anesthésiques locaux ont été préparés avec un mode de prise différent, c'est-à-dire que les cylindres n'ont pas été immergés dans une solution saline à 37 °C pendant 72 h, mais mis dans une étuve saturée en eau à 37 °C pendant 72 h, afin qu'aucune perte de PA ne soit établie. Les fractures des cylindres ont ensuite été observées au MEB après leur métallisation (Figure 26 C). Ainsi, une fois intégrée dans la matrice inorganique, les anesthésiques locaux sont toujours visibles (flêches jaunes). De plus, leur taille et leur morphologie ne semblent pas été altérées par la solution de durcisseur lors de la phase de mélange du ciment.

Les mêmes expériences ont été réalisées pour un temps de prise de 30 min, le but étant que la phase de gâchage soit le seul paramètre à jouer dans l'intégrité des molécules. La prise du ciment a été stoppée par des bains successifs d'acétone pour éliminer l'eau résiduelle. Les images MEB obtenues après cette expérience n'ont pas apporté d'informations supplémentaires à celles réalisées précédemment.

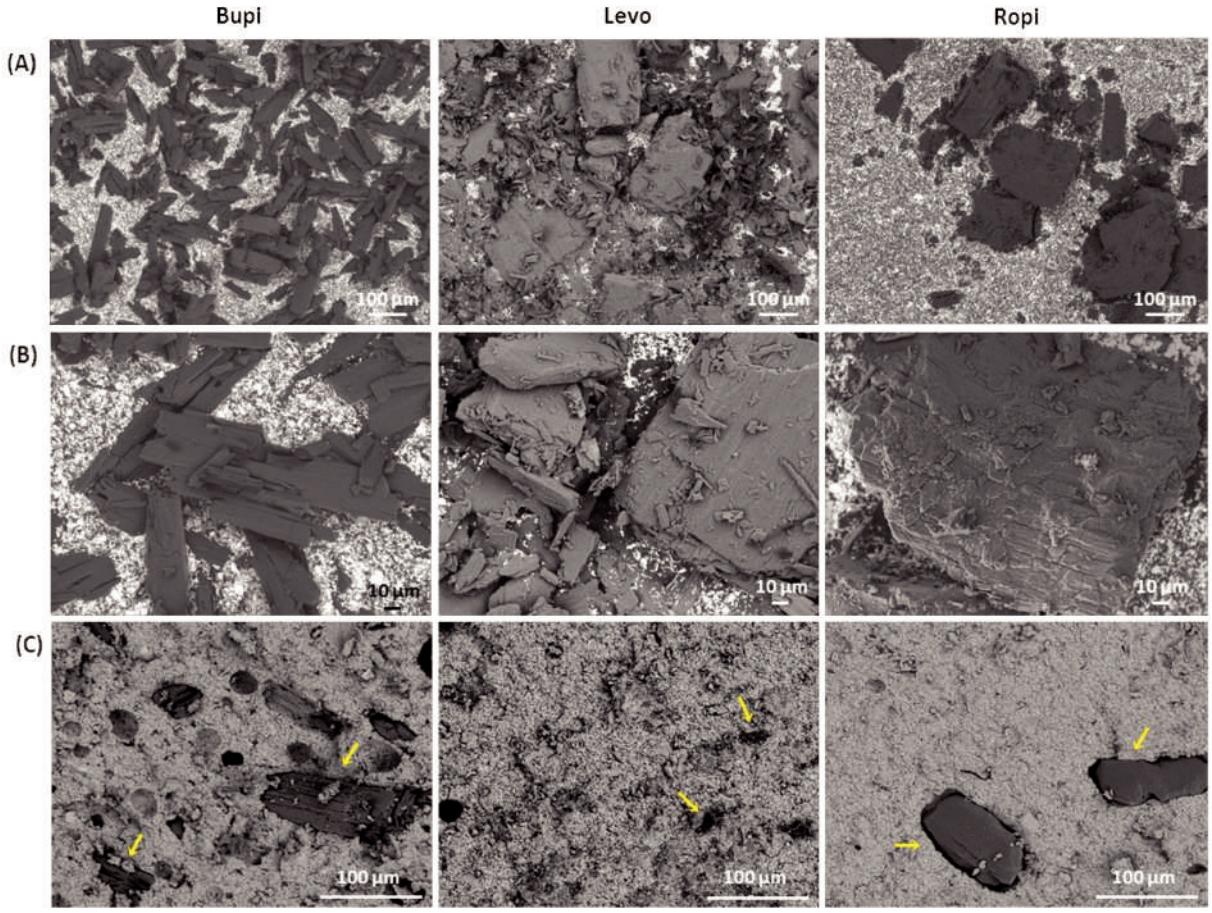


Figure 26 : Photographies MEB des trois anesthésiques locaux (bupivacaïne, levobupivacaïne et ropivacaïne) à différents grandissements (A et B) et des ciments chargés en anesthésiques locaux (C) après 72 h de prise à 37 °C dans une étuve saturée en eau et ← les PA

Cependant il est possible de se demander si les molécules actives sont totalement insolubles dans le liquide durcisseur et donc se trouve entièrement sous forme solide ou alors si elles sont partiellement dissoutes après la phase de mélange.

Pour répondre à cela, des spectres CP-MAS ^{13}C des analgésiques purs et des ciments chargés ont également été réalisés. Les expériences RMN MAS ^{13}C ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker Avance II. Son champ magnétique est de 7,0 T et correspond à des fréquences de Lamor de 300 et 75,5 MHz pour ^{1}H et ^{13}C respectivement. Une sonde de double

résonance de 4 mm et une fréquence de rotation de 12 kHz ont été utilisées. Pour toutes les expériences, un découplage ^{1}H SPINAL-64[218] avec une fréquence de nutation de 70 kHz a été appliqué pendant l'acquisition du signal. Les spectres {^{1}H}-^{13}C- CP-MAS ont été acquis en utilisant un temps de contact de 2,5 ms avec une rampe d'amplitude linéaire[220] sur le canal ^{1}H et un délai de recyclage de 1 s. Les déplacements chimiques ^{13}C ont été référencés par rapport au triméthylesilyle (TMS).

Les CPCs chargés en anesthésiques locaux ont été préparés selon deux modes de prise différents (i) immergé dans une solution saline à 37 °C pendant 72 h, le but étant de mimer le milieu biologique et (ii) dans une étuve saturée en eau à 37 °C pendant 72 h. Cette dernière option permet de se focaliser essentiellement sur la forme des molécules actives après l'étape du mélange et supprime tous les changements provenant de la percolation du NaCl dans le ciment. De plus, cette technique de prise permet de garder la totalité de la molécule active au sein du biomatériau. Les expériences RMN ont été effectuées après avoir stoppé le processus d'hydratation du ciment en mettant les échantillons dans une étuve sèche à 37 °C pendant 1 semaine.

La Figure 27 présente la superposition des spectres de chacune des formulations de ciment (selon les deux modes de prise) avec les spectres des anesthésiques locaux purs. Ainsi, il est observé, grâce aux spectres RMN MAS ^{13}C des formulations de ciments chargés, que les anesthésiques locaux résident sous différentes formes structurales. En effet, il est possible d'observer l'apparition de nouveaux pics sur les spectres des ciments pris dans une solution saline (indiqués par les flèches rouges). Bien que moins accentué dans le cas de la prise en milieu saturé en eau, ceci laisse à penser qu'au cours de la libération du principe actif, la forme primaire (solide) de ce dernier tend à se modifier au cours du temps. Néanmoins, il est impossible de savoir si cette nouvelle forme (ou ces nouvelles formes) est réellement présente au sein du ciment ou si elle provient d'un artefact issu de la recristallisation des molécules actives due à l'arrêt de la réaction de prise.
Les PA se trouvent donc sous la forme solide avec une légère partie dissoute dès l'étape du gâchage du ciment. Pour finir, il est également possible d'observer sur les spectres des ciments chargés des signaux faibles attribués[72] au composant HPMC (2 % en poids dans la phase solide du ciment), indiqué par les astériques.

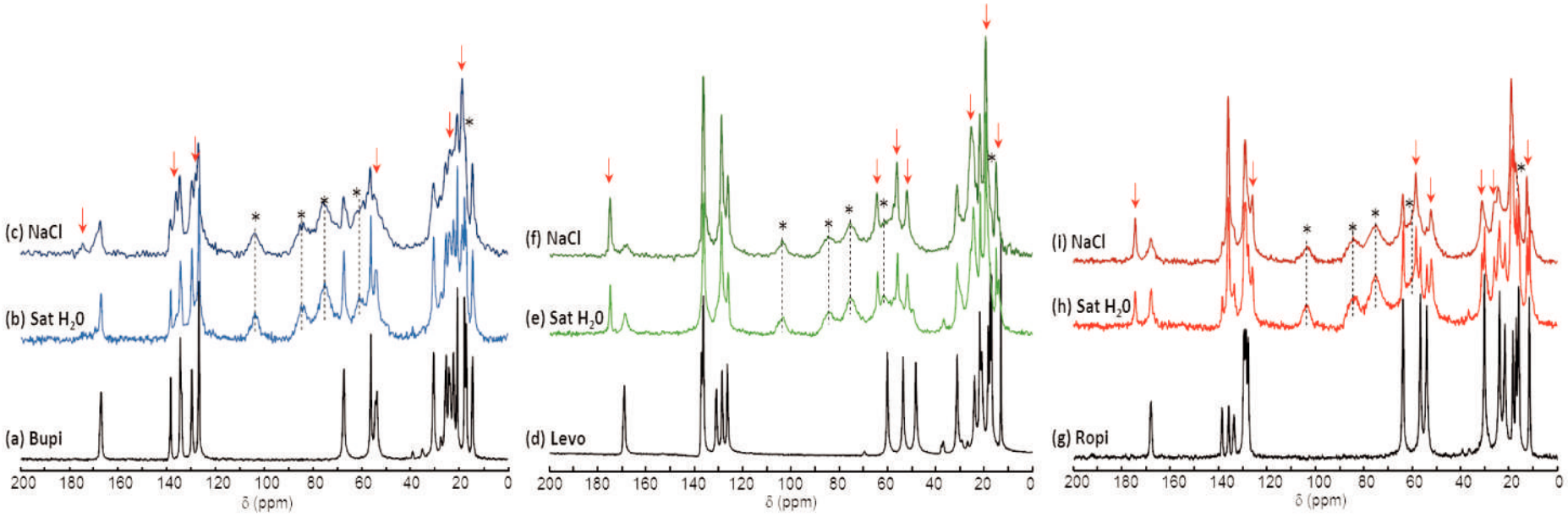


Figure 27 : Spectres RMN MAS ^{13}C des trois anesthésiques locaux purs (a, d, g) et chargé dans le CPC après 72 h de prise à 37 °C dans une étuve saturée en eau (b, e, h) et dans NaCl (c, f, i). ↓ nouveaux pics, * HPMC

3.2. La stérilisation gamma altère-t-elle les principes actifs ?

Les ciments phosphocalciques sont des dispositifs médicaux (DM) destinés à être utilisés en chirurgie osseuse. Dans le cas d'actes chirurgicaux, les DM doivent être exempts de tout micro-organisme et doivent donc être stérilisés. Il existe plusieurs moyens de stérilisation : la vapeur d'eau, l'oxyde d'éthylène et le rayonnement gamma. La stérilisation par vapeur d'eau associe à la fois la chaleur et l'eau (sous forme saturée). L'inconvénient de cette technique est qu'elle met en jeu de l'eau qui peut activer la réaction de prise de nos ciments et donc détériorer ainsi les propriétés du produit final. Ce procédé est donc à exclure. L'oxyde d'éthylène, lui, est un gaz toxique qui possède un temps de désorption relativement long qui exposerait un risque beaucoup trop élevé pour le patient. Ainsi, il apparaît que la stérilisation par rayonnement gamma ou bêta soit la technique la plus favorable pour ce type de biomatériau. La dose utilisée pour ce genre de procédé est d'environ 25 - 33 kGray (kGy). Cette dose relativement élevée peut engendrer une altération au niveau des molécules organiques. Par conséquent, l'intégrité des principes actifs est vérifiée par des analyses post-irradiation de RMN et de spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont été enregistrés sur un Advance Bruker 300 MHz alors que les spectres HRMS ont été enregistrés sur un LTQ-Orbitrap Thermofisher Scientific. Les résultats de chaque analyse sont intégrés dans le Tableau 8.

Les résultats des spectres RMN et HRMS de chaque molécule pré et post-irradiation ne montrent aucune modification structurale des différents PA. Ainsi, ces analyses indiquent que l'intégrité de la bupivacaïne, de la levobupivacaïne et de la ropivacaïne sous forme solide a été préservée. De plus, la libération d'un ciment stérilisé chargé en bupivacaïne dans du D_2O a été également analysée par RMN ^{1}H et ^{13}C. L'association du ciment et de la molécule active a été irradiée dans les mêmes conditions que les poudres. Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés dans le Tableau 8.

En conclusion, après l'association des différents PA (la bupivacaïne, le levobupivacaïne et le ropivacaïne), ces derniers ne sont que très peu impactés. En effet, les études MEB et RMN ^{13}C du solide ont montré que la majorité du PA était sous forme solide après association avec le ciment. Pour finir, il est également possible d'envisager une stérilisation gamma puisque cette méthode n'altère pas la structure de nos PA.

Tableau 8 : Analyses de la bupivacaïne, de la levobupivacaïne et de la ropivacaïne par spectrométrie de masse et RMN liquide (^{1}H et ^{13}C)

	Formule brute	**Traitement**	**HRMS (ESI+) m/z**	**RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ (ppm)**	**RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ (ppm)**
Bupi	$C_{18}H_{28}N_2O$	Non stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 289,2274 $[M+H]^+_{exp}$ = 289,2273	0,91 (t, 3H), 1,37 (six, 2H) 1.58-1,92 (m, 4H), 1,98 (br d, 3H), 2,18 (s, 6H), 2,43 (br d, 1H), 3,06-3,26 (m, 3H), 3,72 (br d, 1H), 4,18 (br d, 1H), 7,16-7,29 (m, 3H).	12,64 (CH_2-$\underline{C}H_3$), 17,19 (2x C-$\underline{C}H_3$), 19,27 (CH_2-$\underline{C}H_2$-CH_3), 20,83 ($\underline{C}H_2$-CH_2-CH-N), 22,27 ($\underline{C}H_2$-CH_2-N), 25,14 ($\underline{C}H_2$-CH_2-CH_3), 28,88 ($\underline{C}H_2$-CH-N), 52,04 ($\underline{C}H_2$-N-CH-CH_2), 56,13 ($\underline{C}H_2$-N), 65,86 (CH-N), 128,29 (2x CH=$\underline{C}$H-C), 128,55 ($\underline{C}$H=CH-C), 131,86 (C-NH) , 135,70 (2x $\underline{C}$-CH_3), 168,46 (C=O)
		Stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 289,2274 $[M+H]^+_{exp}$ = 289,2271		
Levo	$C_{18}H_{28}N_2O$	Non stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 289,2274 $[M+H]^+_{exp}$ = 289,2272		
		Stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 289,2274 $[M+H]^+_{exp}$ = 289,2271		
Ropi	$C_{17}H_{26}N_2O$	Non stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 275,2118 $[M+H]^+_{exp}$ = 275,2117	0,96 (t, 3H,), 1,59-1,92 (m, 4H), 1,98 (br d, 3H), 2,20 (s, 6H), 2,42 (br d, 1H), 3,02-3,24 (m, 3H), 3,72 (br d, 1H), 4,17 (br d, 1H), 7,16-7,28 (m, 3H).	10,16 (CH_2-$\underline{C}H_3$), 16,87 ($\underline{C}H_2$-CH_3), 17,18 (2x C-$\underline{C}H_3$), 20,83 ($\underline{C}H_2$-CH_2-CH-N), 22,27 ($\underline{C}H_2$-CH_2-N), 28,91 ($\underline{C}H_2$-CH-N), 52,06 ($\underline{C}H_2$-N-CH-CH_2), 57,85 ($\underline{C}H_2$-N), 65,74 (CH-N), 128,29 (2x CH=$\underline{C}$H-C), 128,55 ($\underline{C}$H=CH-C), 131,83 ($\underline{C}$-NH) , 135,71 (2x $\underline{C}$-CH_3), 168,43 (C=O)
		Stérilisée	$[M+H]^+_{th}$ = 275,2118 $[M+H]^+_{exp}$ = 275,2115		

4. Études de la libération des anesthésiques in vitro

L'objectif de cette étude est de fournir et de valider une nouvelle approche pour diminuer le risque de développer une douleur chronique après une greffe osseuse autologue de crête iliaque grâce à un dispositif combiné original permettant un soulagement significatif de la douleur pendant les 3 à 4 premiers jours postopératoires.

4.1. Protocole expérimental

Une quantité (1,2 g) de ciment est préparée selon le protocole décrit précédemment (chap II, page 49), soit une concentration de 8 □ en masse d'anesthésique et des rapports L/P de 0,45 pour la bupivacaïne et la levobupivacaïne et 0,48 pour la ropivacaïne. La pâte de ciment, une fois gâchée, est divisée en 3 portions et est ensuite placée dans des moules en silicone (diamètre : 8 mm, hauteur : 5 mm). Après une prise de 20 min à température ambiante, les pastilles sont démoulées, pesées et immergées dans une solution saline (0,9 % w/w, 10 mL). Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37 °C, elle-même placée sur un agitateur orbitalaire (90 tr/min). Des prélèvements de 6 mL de la solution sont effectués régulièrement au cours de l'expérience et la quantité prélevée est immédiatement renouvelée par de la solution fraîche. Les solutions prélevées sont ensuite filtrées (PTFE, 0,45 µm) afin d'éliminer de potentielles particules de ciment qui pourraient altérer les mesures. Les différents anesthésiques locaux libérés sont analysés par spectrométrie UV-visible (CARY 5E UV-VIS-NIR, Agilent) à 262 nm. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'anesthésique libéré (± la valeur maximale et minimale) en fonction du temps.

4.2 Résultats et discussions

4.2.1. Courbes de libération de la bupivacaïne et de la ropivacaïne

On obtient alors les libérations suivantes (Figure 28) des ciments chargés en bupivacaïne et en ropivacaïne. Tout d'abord, une libération dite « flash » est observée dans laquelle environ 20 % des deux principes actifs ont été libérés dans les premières heures (8 h = 0,33 j). Au cours des quatre premiers jours, 68 ± 1 % de la bupivacaïne a été libérée, alors que 72 ± 1 % de la ropivacaïne a été libérée au cours de la même période. À la fin de l'essai (15 jours), la libération cumulative des principes actifs est d'environ 96 ± 1 % et de 100 ± 1 % pour la bupivacaïne et pour la ropivacaïne respectivement.

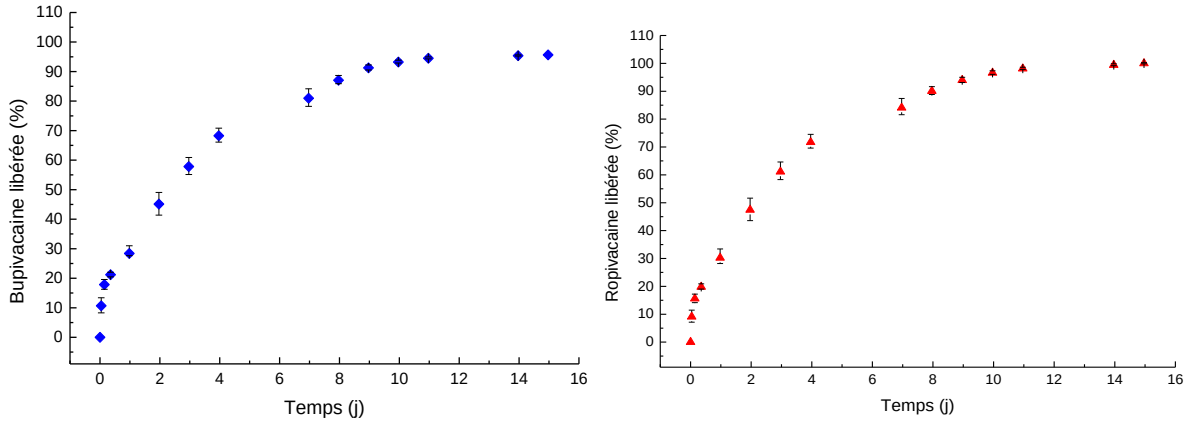


Figure 28 : Libérations de la bupivacaïne (bleu) et de la ropivacaïne (rouge) en fonction du temps

Ces résultats in vitro montrent une libération efficace des deux ciments chargés pendant les trois à quatre premiers jours postopératoires, contrairement à une étude précédente[147] dans laquelle des granules de CDA chargés en bupivacaïne étaient caractérisées par une libération massive du principe actif (80 % en 5 h). Concernant les systèmes de CPCs chargés en anesthésiques locaux proposés dans la littérature, ces derniers montrent une libération de 100 % pour la lidocaïne[148] et de 70 % pour la bupivacaïne et la levobupivacaïne[149] dans les quatre premiers jours. Ces dernières valeurs sont en concordance avec nos résultats. Le choix d'un CPC comme système d'administration de principes actifs semble présenter un intérêt certain pour contrôler la libération progressive de ces substances actives et par conséquent la durée de l'effet analgésique pendant la période la plus critique. Il pourrait donc être possible d'inclure ces types de CPCs chargés dans le protocole d'analgésie multimodale pour remplir le site donneur dans les procédures de greffe osseuse autologue iliaque.

4.2.2. Cinétique de libération : modèles mathématiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la libération de principe actif peut provenir de plusieurs types de mécanisme. Les matrices telles que les CPCs, grâce à leur microstructure poreuse qui permet la circulation des fluides biologiques, connaissent principalement une libération par diffusion du principe actif. Ainsi dans le but de démontrer que ce type de processus est majoritaire au sein de nos différentes formulations de ciment, les profils de libération obtenus ont été comparés selon les modèles établis par Higuchi et Korsmeyer-peppas. Les constantes des deux modèles : a, k, n et r^2 sont répertoriés dans le Tableau 9. Tout d'abord, les deux modèles sont adéquats pour décrire la libération de nos anesthésiques locaux. Le modèle d'Higuchi indique que la quantité d'anesthésique local libérée est proportionnelle à la

racine carrée du temps, ce qui indique que le mécanisme mis en jeu dans la libération des principes actifs est la diffusion de Fick. De plus, il est possible d'observer que la constante a est légèrement supérieure dans le cas de la libération du ciment chargé en ropivacaïne. Ce dernier possède un rapport L/P légèrement supérieur au Bupi-CPC, cette propriété induit une augmentation de la porosité qui favorise les phénomènes de diffusion.[221]

Tableau 9 : Comparaison des profils de libération de la bupivacaïne et de la ropivacaïne selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	**Equation**	**Paramètre**	**Bupivacaïne**	**Ropivacaïne**
Higuchi	$Q\ (\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9907	0,9959
		a	32,93	34,34
Korsmeyer-peppas	$Q\ (\%) = kt^n$	r^2	0,9691	0,9826
		k	34,04	34,53
		n	0,37	0,43

Avec Q, la quantité d'analgésique libérée cumulée.

Dans le modèle de Korsmeyer-Peppas, les valeurs de n confirment également que la libération est contrôlée par la diffusion de Fick. La constante de k étant similaire pour les deux systèmes de libérations, la différence entre les valeurs de n pourrait provenir de la différence de porosité des deux ciments.

Cependant, il est à noter que les analyses sont effectuées in vitro dans un milieu isotonique à pH physiologique et en l'absence de toutes cellules normalement présentes dans l'environnement osseux. Par conséquent, la libération des molécules actives se fait exclusivement grâce au mécanisme de diffusion et non par la combinaison des processus de diffusion et de résorption du biomatériau. Il sera donc important de prendre en compte ce phénomène de remodelage osseux lors de l'implantation de ces biomatériaux. En effet, ce processus d'érosion risque de favoriser la libération des principes actifs par le biais d'une porosité accrue au sein du matériau.

4.2.3. Visualisation de la libération par cartographie raman

La libération du principe actif provient d'une diffusion de Fick et dans le but de visualiser ce processus, une cartographie raman a été réalisée sur des échantillons de ciment contenant de la bupivacaïne. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un spectromètre raman Renishaw InVia reflex équipé d'un mode microscopie et d'une platine XY micrométrique pour la cartographie d'échantillon. Les réglages utilisés pour cette analyse sont les suivants : longueur d'onde du laser : 785 nm, puissance : 50 mW, objectif x 20 et un temps d'exposition : 5 s.

Les échantillons (N = 6) utilisés sont des cylindres de ciments chargés en bupivacaïne (diamètre interne : 6 mm, hauteur : 12 mm). Après 30 min de séchage à température ambiante, chaque cylindre est démoulé, pesé et immédiatement immergé par une solution saline selon le protocole de libération. La suite du protocole de libération est la même qu'expliquée dans la partie 4.1. Dans le but de cartographier les 6 cylindres à des temps différents de libération, ces derniers vont être stoppés, c'est-à-dire que la solution saline est totalement retirée et l'échantillon est ensuite placé dans une étuve à 37 °C. Les temps utilisés pour la cartographie sont les suivants : t = 0, 1, 6, 24, 48 et 72 h. Le pourcentage de bupivacaïne libérée est calculé à partir de la mesure UV et comparé à la courbe de libération de référence de notre formulation. Les cylindres ont ensuite été cassés à l'aide d'un cutter (Figure 29 A). Après une prévisualisation de la surface analysable de l'échantillon (Figure 29 B), la cartographie est réalisée sur la surface d'un rectangle de longueur 6000 µm et de largeur 1500 µm avec un pas en x et y de 150 µm (Figure 29 C). Le temps total par cartographie est de 41 min.

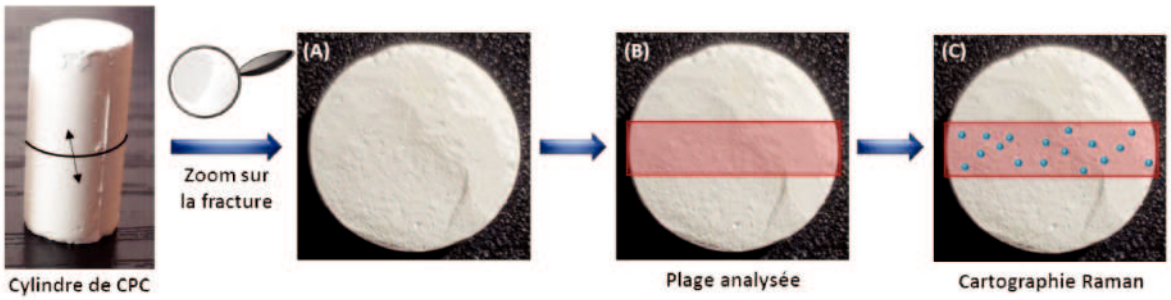


Figure 29 : Protocole de la cartographie par spectroscopie raman. (A) Fracture au cutter du cylindre, (B) prévisualisation de la surface et (C) cartographie.

Les bandes utilisées pour analyser le ciment (Figure 30 A) et la bupivacaïne (Figure 30 B) se situent à 960 cm^{-1} (bande de vibration des phosphates de l'apatite) et 683 cm^{-1} (bande de vibration aromatique de la bupivacaïne). Les mesures ont été réalisées selon plusieurs types de seuillage (i) le premier entre 0 et 9600, permet d'observer la répartition de la bupivacaïne au

sein du ciment analysée (ii) le second entre 9500 et 10500, permet d'observer les points chauds c'est-à-dire la localisation où les molécules sont les plus concentrées. Ainsi, il est possible d'observer sur la Figure 30 C la répartition des points chauds de la bupivacaïne et des phosphates d'un ciment pris après 0 h de libération. Sur cette cartographie, les phosphates sont représentés en vert et la bupivacaïne en rouge, ainsi, il est observé une répartition homogène des différentes espèces dans le biomatériau.

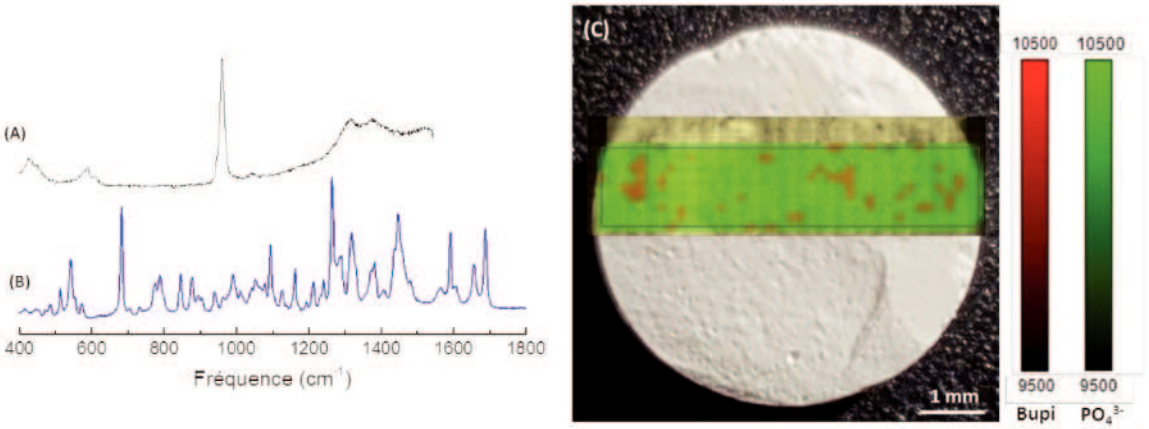


Figure 30 : *Spectre Raman (A) d'un ciment* après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline et (B) de la bupivacaïne et (C) répartition bupivacaïne/phosphate *d'un ciment* chargé après 0 h de prise

La Figure 31 montre la répartition de la bupivacaïne en fonction du temps de libération. Il est alors possible d'observer la répartition homogène de la molécule active quel que soit le temps de libération. De plus, au fur et à mesure de la libération, les extrémités des cylindres perdent de l'intensité vis-à-vis de la bupivacaïne. Le processus de libération commence donc par la partie externe de l'échantillon pour finir vers le centre de celui-ci.

La Figure 32 montre la répartition des points chauds de la bupivacaïne, ce qui permet de localiser les endroits où la bupivacaïne se trouve en forte concentration. Il est à noter qu'un grain de bupivacaïne à une taille d'environ 100 µm, la profondeur analysée ne dépassant pas les 30 µm les points chauds sont donc pour la plupart la visualisation des cristaux du principe actif. Tout d'abord, les grains de bupivacaïne situé sur les bords du cylindre sont en grande majorité dissous par l'effet de la lixiviation du biomatériau par la solution saline. Ensuite, le même processus que précédemment est décrit, c'est-à-dire, que la diffusion de la molécule active débute par les extrémités puis termine par le centre du matériau. La visualisation de ce phénomène est d'autant plus accentuée puisque seuls les grains de bupivacaïne sont observés. Cette dernière représentation sera utilisée pour les calculs de surface présentés ci-après.

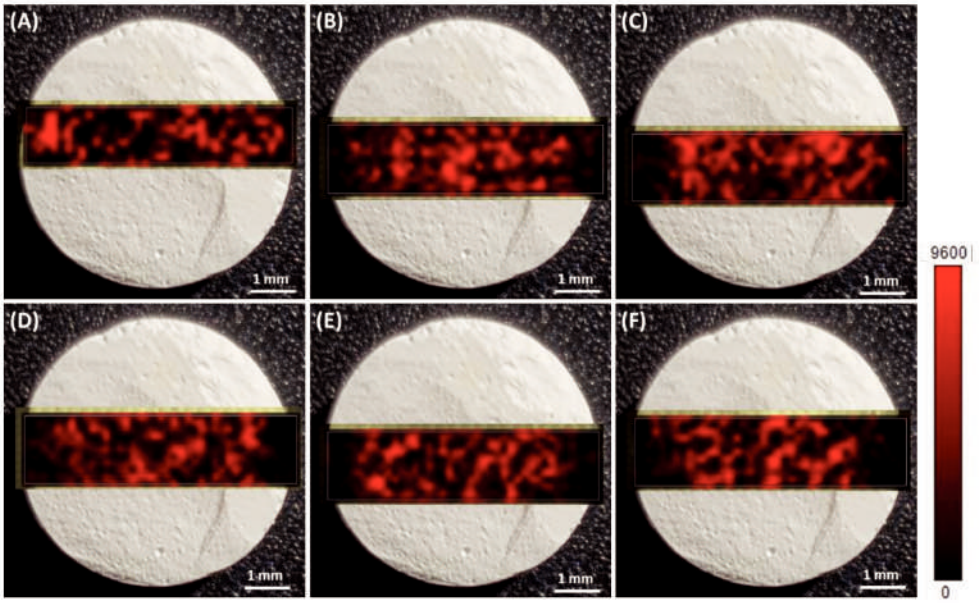


Figure 31 : Répartition de la bupivacaïne par cartographie raman de ciments combinés après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 48 h et (F)72 h de libération à 37 °C dans une solution saline

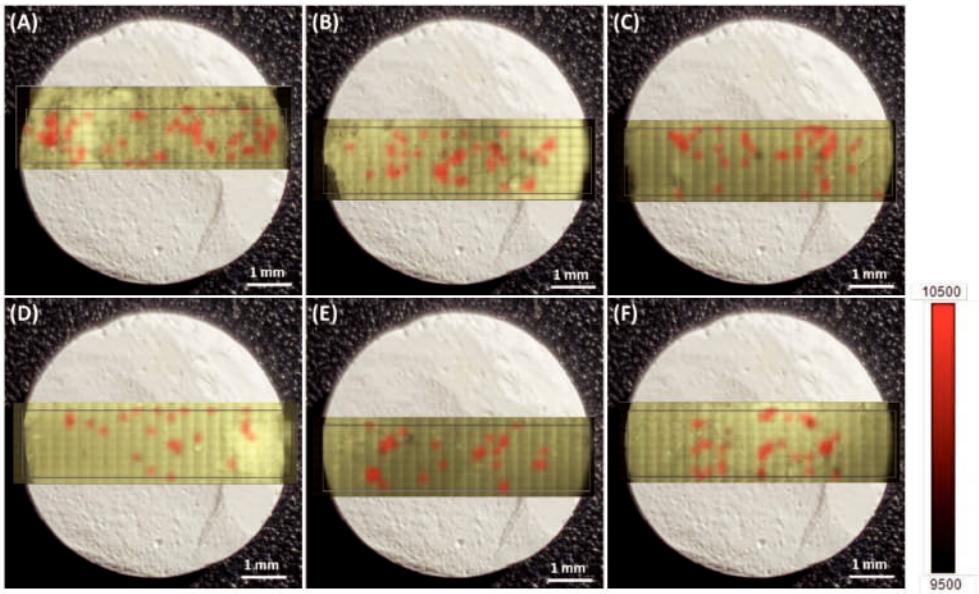


Figure 32 : Représentation des points chauds de bupivacaïne par cartographie raman de ciments combinés après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 48 h et (F)72 h de libération à 37 °C dans une solution saline

La corrélation entre la surface contenant encore du principe actif et la quantité de cette molécule libérée a été étudiée sur toute la période de libération. La Figure 33 représente la simulation de la surface contenant du principe actif (en rouge) dont les cercles ont été tracés à partir de la cartographie avec le seuillage de 9500 à 10500 (points chauds). Le pourcentage de libération de chaque cylindre a ensuite été calculé à partir des mesures UV et comparé avec la libération de référence d'un ciment chargé en bupivacaïne. Ainsi, les pourcentages de la surface contenant encore du principe actif sont semblables avec les pourcentages de bupivacaïne encore présente au sein du biomatériau. Par exemple, il est possible d'observer à 48 h une libération de 44 % de bupivacaïne et une surface encore chargée en principe actif de 58 %. Ces valeurs sont complémentaires. Le même comportement est observable pour la totalité des temps de mesure. Ces observations indiquent que la diffusion du principe actif est homogène sur la période de libération étudiée.

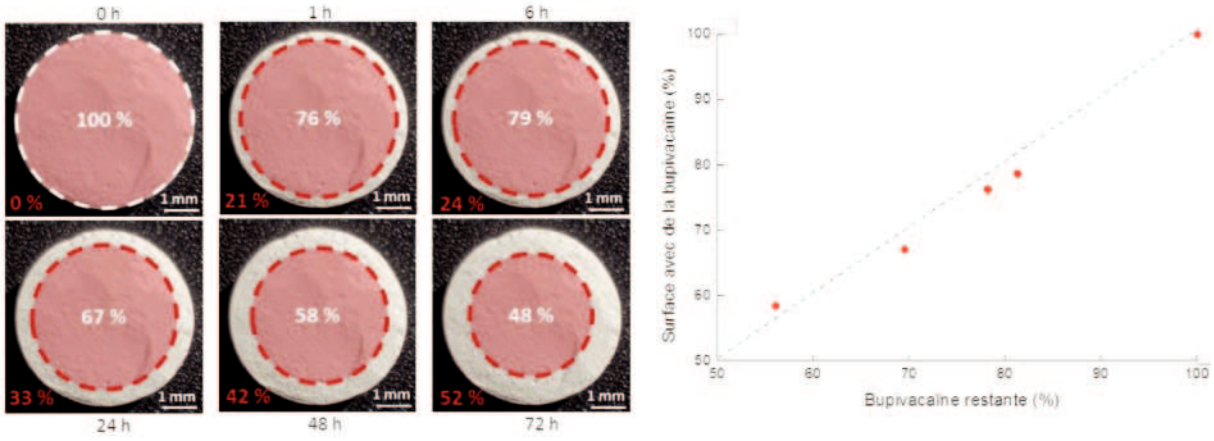


Figure 33 : Corrélation entre la surface contenant de la bupivacaïne et la quantité du PA restant dans le Bupi-CPC

En conclusion, la cartographie raman a permis de visualiser la diffusion du principe actif au sein du ciment. Cette diffusion du principe actif s'exerce donc par la partie extérieure du cylindre vers le centre de celui-ci représentatif de la percolation du milieu physiologique dans le biomatériau. La porosité de ce dernier permet ainsi au liquide de se propager lentement et de manière homogène vers le cœur de la matrice ce qui explique que le principe actif piégé au centre du ciment s'évacue plus difficilement.

4.2.4. Cas de la levobupivacaïne

Contrairement à la bupivacaïne et la ropivacaïne, la levobupivacaïne quant à elle a une libération plus lente (Figure 34). Alors que dans la première période (8 h), il était possible d'observer une libération flash d'environ 20 % pour les ciments chargés en bupivacaïne et ropivacaïne, ici une libération de seulement 10 ± 1 % de levobupivacaïne est obtenue. À quatre jours, 36 ± 1 % du principe actif est libéré (contre environ 70 % pour les deux autres principes actifs). À la fin de l'essai, une libération cumulative d'environ 97 ± 1 % de la molécule est obtenue en 28 jours d'expérimentation.

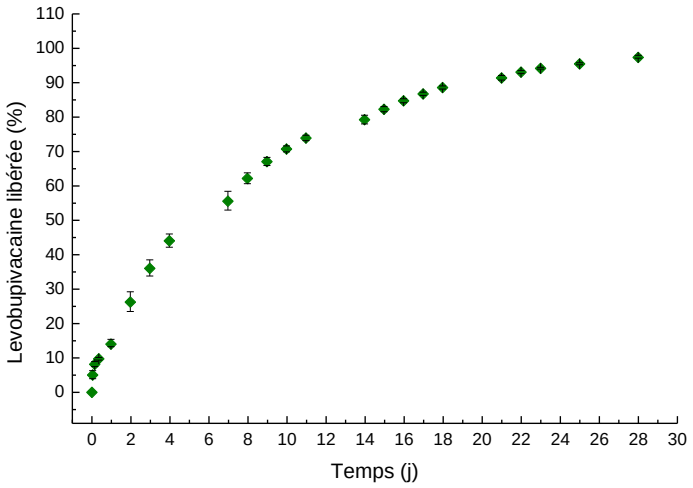


Figure 34 : Libération de la levobupivacaïne en fonction du temps

Concernant le mécanisme de libération, comme les deux autres molécules actives, la libération de la levobupivacaïne correspond relativement bien aux modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas (Tableau 10). Les valeurs de a et de k sont beaucoup plus basses de celles exprimées pour la bupivacaïne et la ropivacaïne, ce qui révèle que la libération est plus lente (comme observé expérimentalement). La valeur de n étant de 0,48 indique que le mécanisme de libération est une diffusion non-fickienne, c'est-à-dire qu'il combine à la fois des processus de diffusion et d'érosion.

Tableau 10 : Comparaison des profils de libération de la levobupivacaïne selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	Equation	Paramètre	Levobupivacaïne
Higuchi	$Q\ (\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9912
		a	20,53
Korsmeyer-peppas	$Q\ (\%) = kt^n$	r^2	0,9593
		k	19,62
		n	0,48

Plusieurs hypothèses sont émises à cette différence de libération, que nous devons vérifier, (i) la granulométrie des principes actifs et (ii) la forme structurale (pseudo-polymorphisme et polymorphisme) dans laquelle ils se trouvent au sein du CPC.

4.2.4.1. Influence de la granulométrie

Dans le but de mieux appréhender les variations observées entre les différentes formulations de ciments combinés, des essais de granulométrie ont été faits. Cette étape a été réalisée par l'intermédiaire d'un broyage manuel. La granulométrie laser, est la technique majoritairement utilisée pour la mesure des particules solides comprise entre 0,05 et 900 µm. Néanmoins, elle requiert une quantité importante d'échantillon (environ 1 g par mesure), pour des raisons de coût, nous avons donc choisi d'étudier la taille de nos anesthésiques broyés par MEB (Figure 35). Les particules obtenues possèdent une taille allant de 0,5 à quelques µm comparée aux poudres de départ dont la taille variait de 100 à 200 µm.

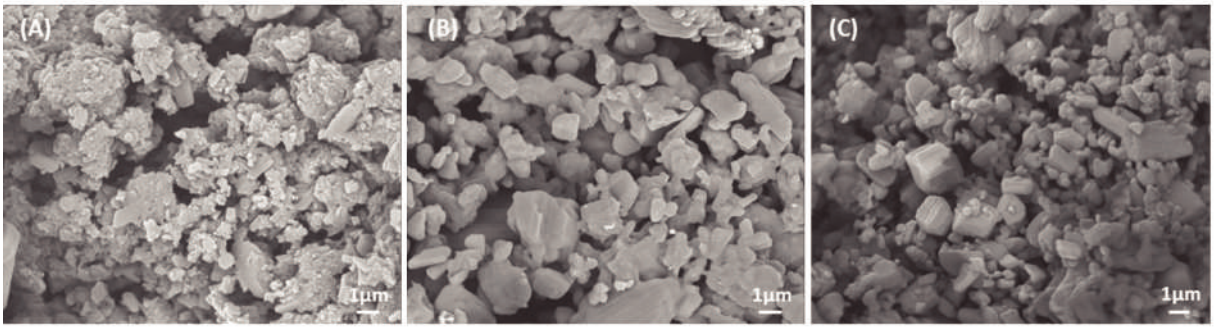


Figure 35 : Photographies MEB des trois anesthésiques locaux broyés : bupivacaïne (A), levobupivacaïne (B) et ropivacaïne (C)

La cinétique de dissolution des différentes poudres d'anesthésiques locaux a été testée avant et après broyage. Les mesures sont réalisées par spectrométrie UV-visible grâce à un module Peltier (Dual Cell Peltier Accessory, Varian Cary) permettant d'homogénéiser par agitation la solution in situ à une température fixée. Les différents échantillons ont été testés dans une solution saline à 0,9 % en masse. Les paramètres utilisés sont les suivants : température ambiante : 22 °C, vitesse d'homogénéisation : 6/12 et l'absorbance (à 212 nm) a été enregistrée toutes les 0,1 sec pendant 5 min. Toutes les expériences ont été réalisées cinq fois consécutivement et les courbes exposées Figure 36 sont les moyennes des expériences.

La Figure 36 présente les cinétiques de dissolution des antalgiques avant et après broyage, les tangentes ont été tracées dans le but de comparer leur vitesse de dissolution respective. Tout d'abord, les cinétiques de dissolution de la bupivacaïne et de la ropivacaïne sont semblables et les coefficients directeurs des tangentes ne sont pas significativement différents. En revanche, concernant la levobupivacaïne, le coefficient directeur est plus grand comparé aux autres molécules, ce qui indique une vitesse de dissolution plus rapide. Cette observation paraît logique et en corrélation avec la taille des cristaux des poudres. En effet, la levobupivacaïne possède des cristaux d'environ 30 µm, de ce fait la surface mise en contact avec le solvant est plus grande, ce qui explique la vitesse plus rapide de dissolution malgré une solubilité similaire des antalgiques (50 mg/ml).

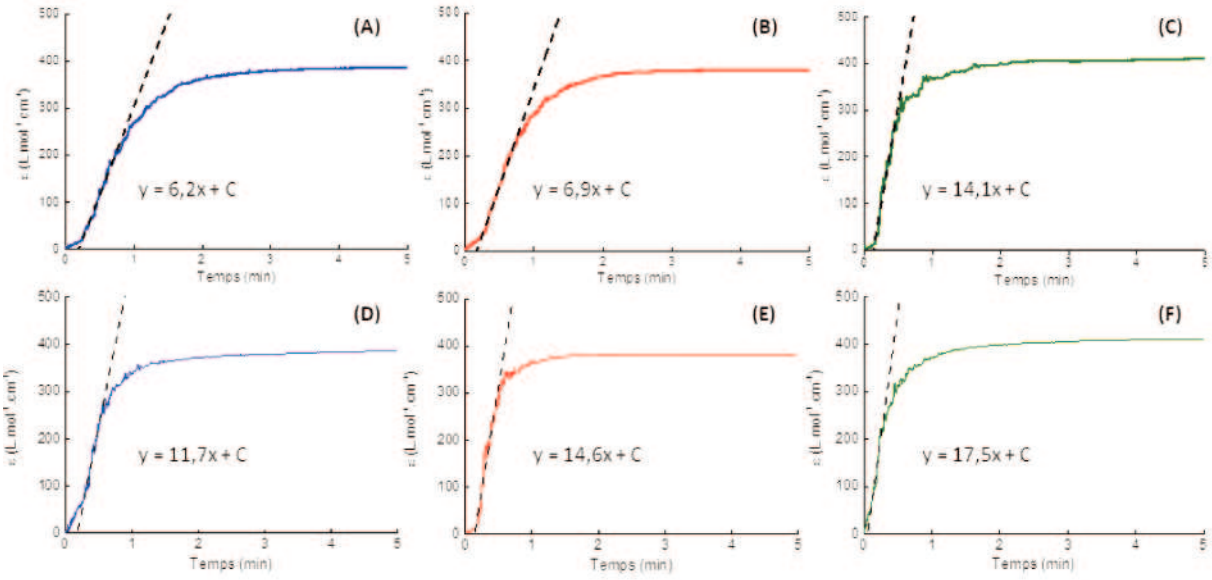


Figure 36 : Cinétique de dissolution des anesthésiques locaux non broyés (A, B, C) et broyés (D, E, F) dans une solution NaCl à 22 °C avec (A, D) bupivacaïne, (B, E) ropivacaïne et (C, F) levobupivacaïne)

Après le broyage des poudres, il est possible d'observer que les trois cinétiques de dissolution des composés sont plus rapides, avec des cinétiques de la bupivacaïne et de la ropivacaïne proches de celle de la levobupivacaïne avant broyage. Par conséquent, la granulométrie a un impact sur la cinétique de dissolution.

Par la suite, des ciments ont été préparés selon la formulation décrite précédemment avec les poudres (de bupivacaïne et de ropivacaïne) broyées, le but étant de pouvoir comparer la nouvelle cinétique avec celle de la levobupivacaïne.

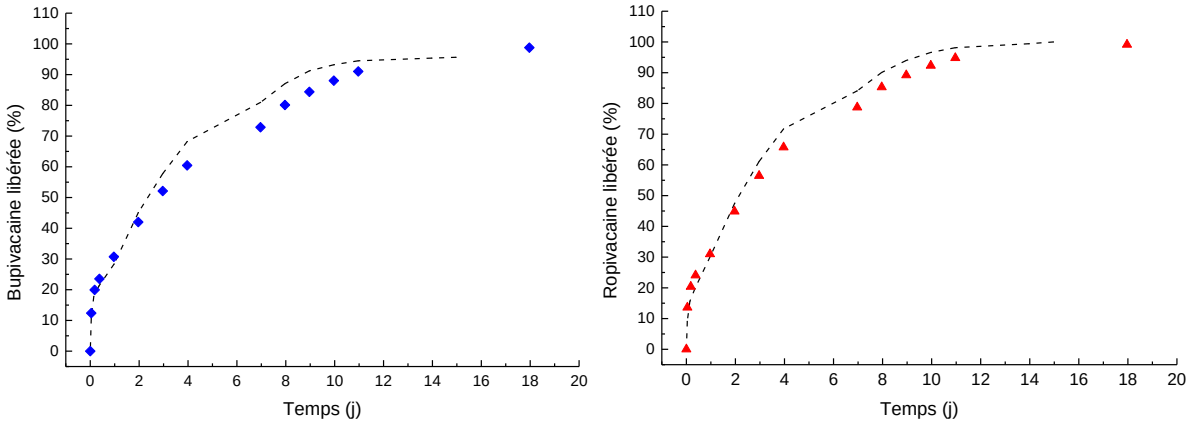


Figure 37 : Libérations de la bupivacaïne (bleu) et de la ropivacaïne (rouge) broyées en fonction du temps avec - - - les courbes de référence des PA non broyés

Deux changements mineurs (statistiquement non significatifs) sont observés par rapport aux premières libérations (Figure 37). Tout d'abord, une augmentation de la libération des deux principes actifs est observée entre 0 et 24 h, ceci s'explique par la taille des cristaux plus petits qui leur permettent d'être solubilisés beaucoup plus rapidement. Deuxièmement, la libération est ralentie comparé aux ciments chargés en principe actif non broyé. Cette observation pourrait provenir d'une différence de la porosité secondaire engendrée par la dissolution du PA. En effet, il a été démontré qu'après la dissolution du principe actif une porosité supplémentaire s'ajoute au volume poreux déjà existant au sein du CPC.[222] Cette porosité secondaire est fonction de la taille du PA ainsi que de la quantité ajoutée au biomatériau. Notre hypothèse est donc que les pores créés par la dissolution du principe actif sont plus petits dans le cas où le PA est broyé ce qui expliquerait que la cinétique de libération soit plus lente à partir de 24 h. Pour confirmer cette hypothèse, la mesure de la porosité des échantillons post-libération serait nécessaire.

Les paramètres de libération des anesthésiques locaux broyés du Bupi-CPC et du Ropi-CPC sont référencés dans le Tableau 11 ci-dessous. Les paramètres a et k n'ont pas varié, seul n a subit un changement plus « marqué ». La diminution de ce paramètre prouve que la cinétique de libération totale a été ralentie par la taille des grains.

Tableau 11 : Comparaison des profils de libération de la bupivacaïne et la ropivacaïne après broyage selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	**Équation**	**Paramètre**	**Bupi Broyée**	**Ropi Broyée**
Higuchi	$Q(\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9893	0,9856
		a	31,04	33,38
Korsmeyer-peppas	$Q(\%) = kt^n$	r^2	0,9850	0,9720
		k	34,68	35,48
		n	0,34	0,32

Les tests de libérations en fonction de la granulométrie différente ont permis de montrer que ce paramètre ne semble pas avoir d'impact significatif sur la libération des différents PA.

4.2.4.2. Influence de la structure

Il existe différentes formes solides sous lesquelles un composé pharmaceutique peut se trouver comme les formes polymorphiques, solvatées, désolvatées ou encore amorphes.[223]
Les solvates cristallins sont des adduits solides cristallins composés d'une molécule et d'un solvant, on parle alors dans ce cas de pseudopolymorphisme. Le solvant, quel qu'il soit, peut apparaître en quantité soit stœchiométrique soit non stœchiométrique dans le réseau cristallin. Les adduits de solvant ont la possibilité de cristalliser facilement ce qui améliore considérablement le conditionnement de la molécule active, ceci peut s'expliquer par la symétrie de l'adduit, par des changements de conformation et par la capacité de former des liaisons hydrogène entre le solvant et le principe actif. Dans le cas où le solvant utilisé est de l'eau, le solvate est nommé hydrate. La bupivacaïne et la ropivacaïne sont tous les deux sous forme de chlorhydrate monohydrate alors que la levobupivacaïne, lors de sa synthèse est lyophilisée et se trouve par la suite être sous forme seulement d'un chlorhydrate. Ainsi, nous avons voulu tester si cette différence pouvait avoir un impact sur la cinétique de libération.

L'élimination des molécules d'eau des cristaux de bupivacaïne et de ropivacaïne, a tout d'abord été testée par lyophilisation des poudres, cependant cet essai s'est avéré non concluant. Donc,

dans le but de trouver la température adéquate pour la déshydratation de nos molécules, nous avons réalisé des analyses de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et thermogravimétrique (ATG). Les différentes courbes thermiques des anesthésiques locaux sont présentées sur la Figure 38 A. Il est observé pour la bupivacaïne un large pic de transition endothermique à 111 °C, le même phénomène est observé pour la ropivacaïne avec cependant un pic endothermique plus fin à 116 °C. Les lots de bupivacaïne et de ropivacaïne dont nous disposons sont sous forme de monohydrate, par conséquent il est possible d'attribuer le premier pic de la courbe DSC à la transition du monohydrate vers la forme anhydre. Les pics endothermiques nets à 249 °C et 264 °C pour la bupivacaïne et la ropivacaïne respectivement sont dû à la fusion des formes déshydratées,[223,224] ce phénomène est suivi de la décomposition thermique des molécules. La courbe DSC de la levobupivacaïne montre un changement de conformation à 88,2 °C.[225] La valeur de température du pic de fusion de la forme anhydre n'a pas changé de manière significative comparée à celle de la bupivacaïne (T = 252 °C).

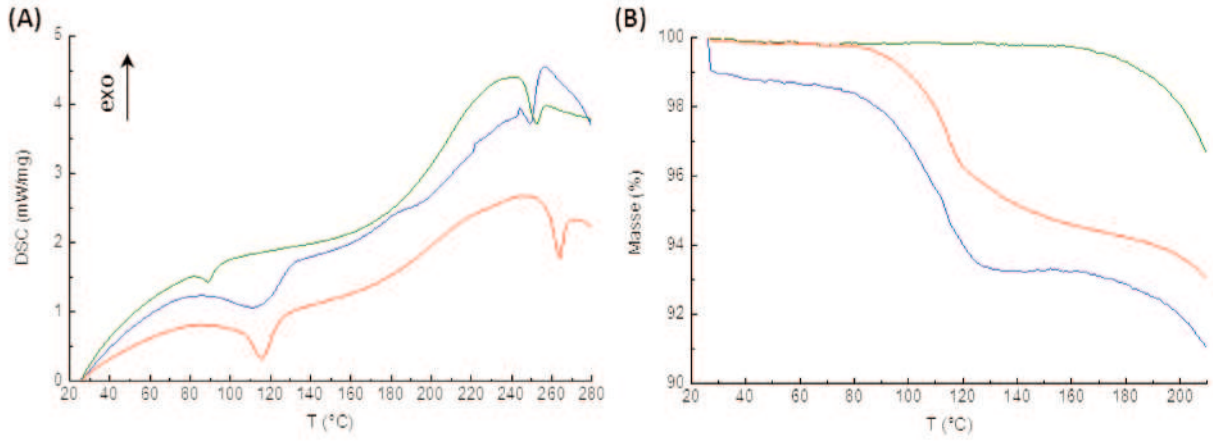


Figure 38 : Courbes DSC (A) et ATG (B) de la bupivacaïne (bleu), de la ropivacaïne (rouge) et de la levobupivacaïne (vert)

Concernant les courbes ATG (Figure 38 B), la bupivacaïne et la ropivacaïne montrent la perte d'eau à partir de 75 °C indiquant une stabilité thermique plutôt faible. Le changement de masse de 5,8 % et 5,5 % confirme le rapport stœchiométrique d'une mole d'eau par mole de chlorhydrate de bupivacaïne et de chlorhydrate de ropivacaïne respectivement (dont les pertes de masse théoriques sont de 5,3 %, 5,5 %). La courbe ATG de la levobupivacaïne montre une faible perte de masse d'environ 0,2 % entre 30 °C jusqu'à 120 °C, ce qui confirme que le pic observé à 87 °C sur la courbe DSC est bien un changement de conformation et non une perte d'eau dont la perte de masse serait plus significative. Il s'ensuit une perte de masse brutale, à partir de 160 °C pour la bupivacaïne et la levobupivacaïne et de 180 °C pour la ropivacaïne,

représentative de la sublimation de la molécule. Ce processus de sublimation peut être reconnu sur la courbe ATG grâce à la diminution continue et totale de la masse de chaque échantillon (la partie de la courbe allant de 210 °C à 300 °C n'étant pas visible sur la Figure 38 B).

Ainsi, dans le but d'étudier l'impact du pseudopolymorphisme existant entre la bupivacaïne et la ropivacaïne et de le comparer avec la levobupivacaïne, l'élimination des molécules d'eau liées dans la structure des anesthésiques locaux a donc été réalisée à l'aide d'une étuve réglée à 120 °C. L'utilisation d'une température supérieure à 120 °C engendre une détérioration des molécules observables par un changement de couleur (jaunissement) de la poudre des antalgiques. L'aboutissement de ce phénomène sera contrôlé par spectroscopie infrarouge. Le Tableau 12 ci-dessous résume les bandes principales des différentes molécules et permet ainsi de comparer les bandes de vibration représentatives de la bupivacaïne et de la ropivacaïne monohydrate avec celles de la levobupivacaïne.

Tableau 12 : Résumé des principales bandes de vibrations des différents groupements des anesthésiques locaux utilisés

Groupement	**Bupivacaïne (.HCl.H_2O)**	**Levobupivacaïne (.HCl)**	**Ropivacaïne (.HCl.H_2O)**
	Nombre d'onde (cm^{-1})	Nombre d'onde (cm^{-1})	Nombre d'onde (cm^{-1})
O-H	3516	3434	3516
N-H	3250	3104	3281
C-H	2962 et 2652	2954 et 2655	2952 et 2662
C=O (Amide I)	1689 et 1657	1674	1687 et 1659
C-N-H (Amide II)	1564	1539	1557
C-N (Amide III)	1290	1285	1292
=C-H arom	773	788	785

Il est alors possible d'observer quelques changements notables qui nous seront utiles pour la suite des analyses. Par exemple, la bande d'élongation du groupement N-H se situe pour la levobupivacaïne à 3104 cm^{-1}. Dans le cas de molécules hydratées, cette bande est significativement déplacée vers des fréquences plus élevées 3250 cm^{-1} pour la bupivacaïne et 3281 cm^{-1} pour la ropivacaïne. D'autre part, la bande d'élongation du groupement carbonyle (νC=O, amide I) est présente sous la forme d'un singulet pour la levobupivacaïne et d'un doublet pour les deux autres molécules. Cette dernière représentation résulte de la présence de plusieurs modes de vibration en simultanée (i) l'élongation du groupement carbonyle seul vers 1660 cm^{-1} et (ii) la vibration correspondant à l'hydrogène (de la molécule d'eau) liée au

groupement carbonyle vers 1690 cm^{-1}. Cette dernière bande servira de repère pour suivre la déshydratation de nos molécules actives.

Les spectres IR du chlorhydrate de bupivacaïne monohydrate (Bupi.HCl.H_2O) et du chlorhydrate de ropivacaïne monohydrate (Ropi.HCl.H_2O) sont comparés respectivement avec celui du chlorhydrate de bupivacaïne (Bupi.HCl), du chlorhydrate de ropivacaïne (Ropi.HCl) et du chlorhydrate de levobupivacaïne (Levo.HCl) sur la Figure 39.

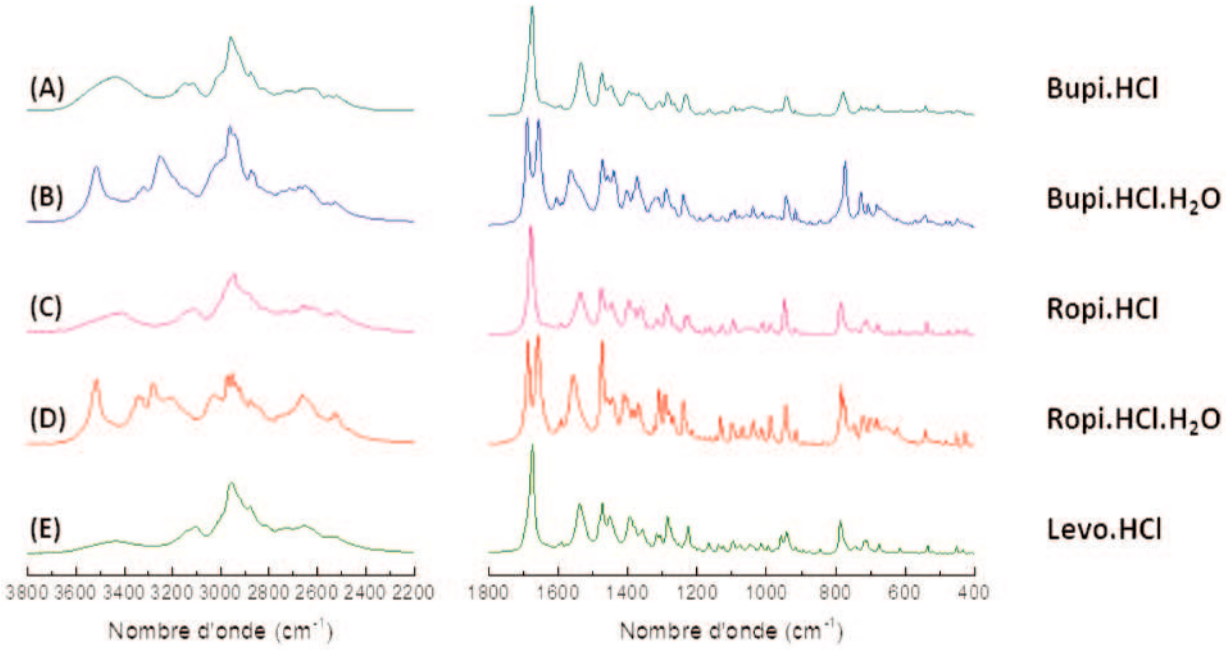


Figure 39 : Spectres IR de (A) la bupivacaïne déshydratée (bleu clair), (B) la bupivacaïne hydratée (bleu foncé), (C) la ropivacaïne déshydratée (rouge clair), (D) la ropivacaïne hydratée (rouge foncé) et (E) la levobupivacaïne anhydre (vert)

Que ce soit la bupivacaïne ou la ropivacaïne, des changements similaires sont observés au niveau des spectres IR. Les spectres des molécules déshydratées présentes des bandes d'élongation du groupement O-H et du groupement N-H déplacées vers les basses fréquences par rapport à la forme monohydrate. La bande d'élongation du C-H, également déplacée vers des fréquences plus faibles, indique selon la littérature,[223,225] un changement de forme de type pseudo-polymorphique. Pour finir, la vibration du groupement carbonyle apparaît comme un seul pic dans les deux échantillons déshydratés et indique une réorganisation du réseau cristallin survenu lors du processus de déshydratation. Pour finir, ce processus semble non réversible puisque l'étude de sa stabilité n'a montré aucun changement après 6 mois dans des conditions

ambiantes (23 ± 2 °C). Ainsi, les spectres obtenus étant similaires à celui du chlorhydrate de levobupivacaïne, il est possible de s'attendre à des interactions semblables avec le ciment, lors de leur association.

Les poudres d'anesthésiques locaux déshydratés ont ensuite été mélangées à la poudre de ciment et les ciments combinés ont été préparés selon la formulation décrite précédemment. Néanmoins, les libérations de ces derniers n'ont montré aucune différence avec les libérations effectuées sans déshydratation.

Afin de valider ou d'invalider la cause du polymorphisme dans la cinétique de libération de la levobupivacaïne, nous avons testé un deuxième lot du composé provenant d'un fournisseur différent. Les polymorphes sont des molécules qui possèdent une composition chimique identique, mais avec des arrangements différents soit (i) de conformères équivalentes soit (ii) de conformères différents soit (iii) association des deux dans le réseau cristallin. De nos jours, plus de 50 % des principes actifs présentent un polymorphisme. En raison des différences structurales, les formes solides peuvent montrer des modifications au niveau des températures de fusion et de sublimation, de la conductivité, de la densité, de la forme cristalline, de la couleur, de l'indice de réfraction, de la solubilité, de la vitesse de dissolution,[226] de la stabilité et parfois même au niveau de la biodisponibilité[227] ou de la toxicité.[228]

En comparant les deux poudres de levobupivacaïne (Figure 40) par microscopie, il est observé une importante différence au niveau de la granulométrie de chacune d'entre elles. Alors que la levo (lot1) présente une forte inhomogénéité (forme et taille, 30 à 200 µm), la levo (lot2) se présente sous la forme d'amas de petits cristaux d'une taille de quelques µm. La cinétique de dissolution de la levobupivacaïne (lot 2) n'a montré aucun changement par rapport au lot 1.

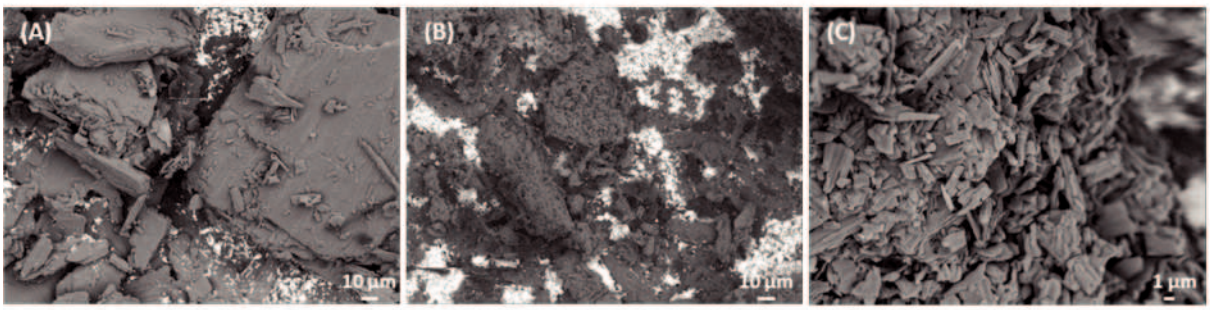


Figure 40 : Photographies MEB de la levobupivacaïne lot 1 (A) et lot 2 (B, C)

Il existe 4 formes polymorphiques de la levobupivacaïne, toutes détaillées dans la publication.[225] D'après cette publication, ces formes peuvent facilement être distinguées grâce à leur diffractogramme par les pics situés entre 5° et 15° 2θ. Ainsi, les pics représentatifs (Figure 41) de nos échantillons sont 9,71 ; 10,66 ; 12,64 et 13,36° 2θ pour la levo (lot 1) et 5,37 et 10.73° 2θ pour la levo (lot 2). Il paraît, alors, que la levo (lot 1) soit répertoriée comme une forme commerciale, thermodynamiquement stable à température ambiante. En revanche, la levo (lot 2) se trouve être composée d'une forme commerciale métastable. Cette structure stable pendant quelque mois en condition ambiante évolue en une autre forme, celle du lot 1 de levobupivacaïne. De plus cette forme est obtenue par déshydratation du monohydrate, ce qui explique les pics 18,60 et 26,58° 2θ qui apparaisse exclusivement sur le diffractogramme du monohydrate.

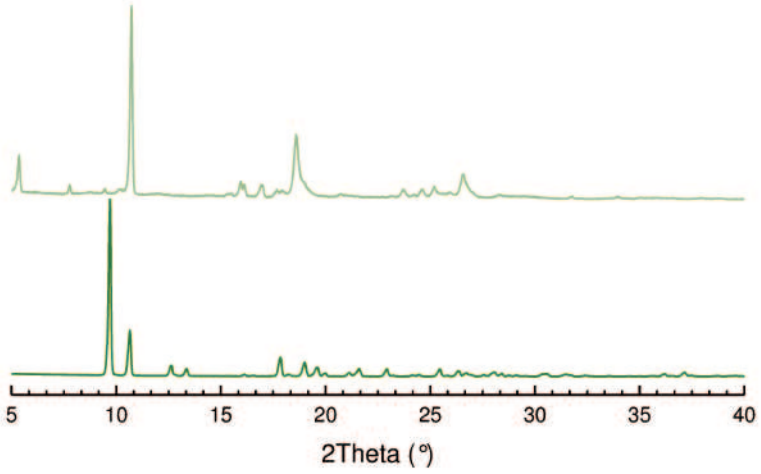


Figure 41 : Diffractogrammes de la levobupivacaïne lot 1 (vert foncé) et lot 2 (vert clair)

Néanmoins, la pDRX est une technique assez limitée pour détecter des changements structurels légers ainsi que pour fournir des informations spécifiques sur les origines intra et intermoléculaires du polymorphisme. Pour compléter cette analyse structurale, nous avons étudié les spectres IR de ces deux polymorphes (Figure 42). Ces derniers présentent des différences dans la région inférieure à 1300 cm^{-1}, notamment des bandes qui sont décalées entre les deux molécules à 1300 et 1230 cm^{-1}. Dans cette région, la levo (lot 1) montre un doublet très caractéristique avec des positions de pic à 958 et 942 cm^{-1}, alors que dans la levo (lot 2), seule une bande à 944 cm^{-1} est observée. D'autres différences se produisent dans la région entre 800 et 700 cm^{-1}, notamment au niveau de la déformation des CH aromatiques en dehors du plan (situé entre 750 et 825 cm^{-1}).

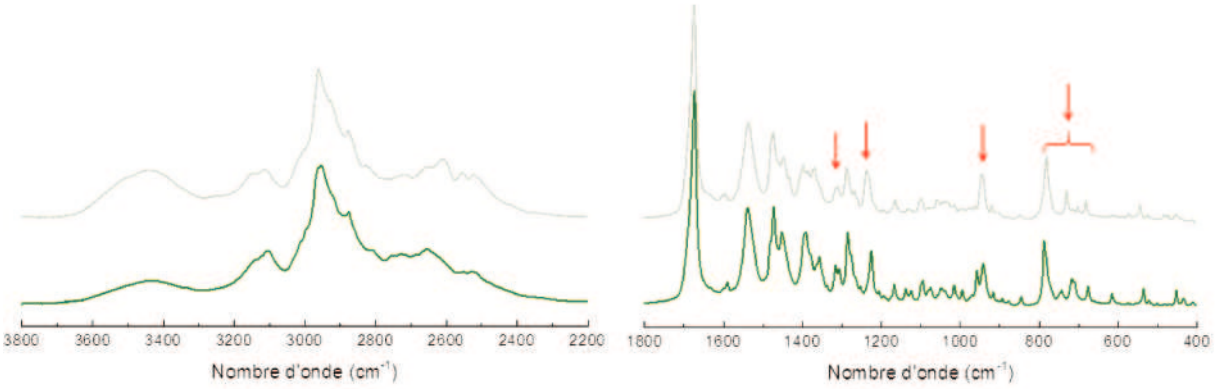


Figure 42 : Spectres IR de la levobupivacaïne lot 1 (vert foncé) et lot 2 (vert clair)

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C liquide obtenus à partir les deux lots de levobupivacaïne étant totalement identiques, ceci confirme qu'il s'agit de deux conformères différents de la molécule. Afin, de compléter ces expériences, la RMN du solide apparaît comme un excellent apport. En effet cette technique à l'avantage d'être extrêmement sensible aux changements des environnements locaux des noyaux résultant de modifications structurelles. Ainsi, grâce aux spectres RMN MAS ^{13}C, il est observé que ces derniers sont totalement différents (Figure 43). En effet, hormis le pic correspondant au carbone de la fonction carbonyle à 170 ppm, tous les autres pics ont des déplacements chimiques différents. Néanmoins, la publication Hamaed et al.[229] qui traite de l'analyse structurale du polymorphisme de différents produits pharmaceutiques par RMN ^{13}C et ^{35}Cl, permet d'apporter des informations concernant la phase de la levo (lot 2). En effet, après avoir chauffé des cristaux de chlorhydrate de bupivacaïne successivement à 120 °C puis à 170 °C, deux formes polymorphiques de cette molécule ont été obtenues. En comparant leur diffractogramme et le spectre RMN ^{13}C du composé obtenu à 170 °C, il est possible de s'apercevoir que leurs analyses sont relativement proches des nôtres. Afin d'expliquer les composés obtenus, les auteurs se sont référés à la publication de Lubach et al.[230] Ces derniers expliquent que le spectre RMN ^{13}C du composé issus de la déshydration de la bupivacaïne monohydrate à 170 °C pourrait être composé soit (i) de deux sites différents cristallographiquement non équivalents soit (ii) d'un mélange de deux formes différentes. Au regard de nos analyses pDRX, cette dernière hypothèse nous semble la plus valable. Toutefois aucune des deux publications n'a conclu sur une possible interprétation structurelle des polymorphes.

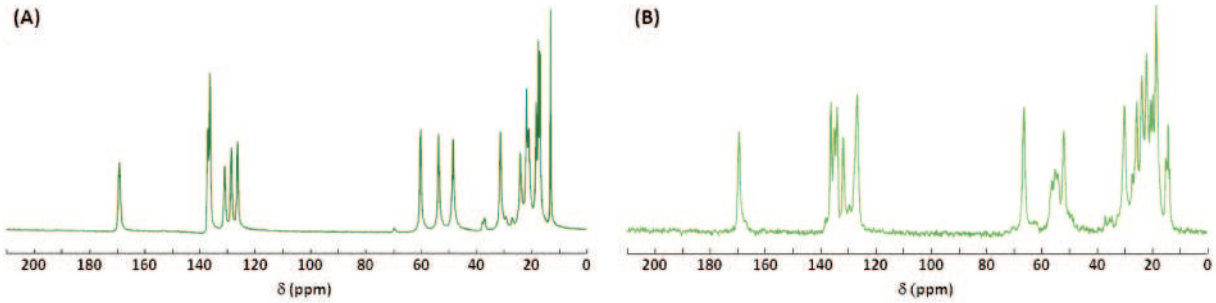


Figure 43 : Spectre RMN MAS ^{13}C de la levobupivacaïne lot 1 (A) et lot 2 (B)

Dans l'optique de comparer la libération de ces deux polymorphes, la poudre de levobupivacaïne (lot 2) a été ajoutée à la poudre de ciment selon la même méthode d'association que le lot 1. La libération du ciment a été effectuée puis comparée au premier lot de levobupivacaïne. Les cinétiques de libération obtenues sont totalement différentes (Figure 44). Le ciment combiné en levo (lot 2) libère, tout d'abord, 25 ± 1 % du principe actif dans la première période (8 h) contre 10 ± 1 % pour la levo (lot 1). A quatre jours, 63 ± 1 % du principe actif a été libéré (contre environ 36 ± 1 %). À la fin de l'essai, une libération cumulative d'environ 100 ± 1 % de la molécule est obtenue en 21 jours d'expérimentation au lieu de 28 jours.

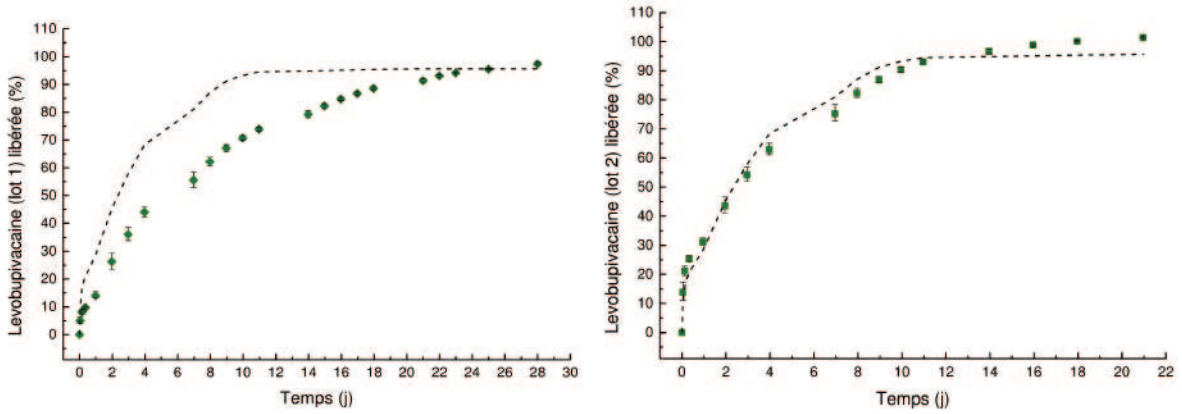


Figure 44 : Libération de la levobupivacaïne (lot1) et de la levobupivacaïne (lot2) en fonction du temps et comparaison avec la libération de la bupivacaïne broyée (---)

Concernant, les mécanismes de libération (Tableau 13), les valeurs de a et k de la levo (lot 2) sont nettement supérieures de celles de la levo (lot1), ce qui indique une libération plus rapide. En revanche, la valeur de n de la levo (lot 2) est plus basse que celle exprimée pour la levo (lot 1). Précédemment nous avions dit que cette variation était caractéristique d'une libération plus lente. En pratique, il a été observé une libération plus rapide dans le cas de la levo (lot 2), ce qui montre que le paramètre k doit être priorisé par rapport au paramètre n dans ce cas de figure. En comparant les paramètres du processus de libération de la levo (lot2) et de la bupivacaïne (broyée), ces derniers sont relativement proches, autant pour le mécanisme décrit par Higuchi que celui décrit par Korsmeyer-Peppas. Cette comparaison est observable sur la Figure 44 et le Tableau 13.

Tableau 13 : Comparaison des profils de libération de la levobupivacaïne (lot1) et de la levobupivacaïne (lot2) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	Equation	Paramètre	Levo (Lot 1)	Levo (Lot 2)	Bupi Broyée
Higuchi	$Q\ (\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9919	0,9820	0,9893
		a	20,53	32,37	31,04
Korsmeyer-peppas	$Q\ (\%) = kt^n$	r^2	0,9593	0,9726	0,9850
		k	19,62	36,64	34,68
		n	0,48	0,31	0,34

5. Conclusions

L'ajout d'anesthésiques locaux ne modifie pas de manière drastique les propriétés usuelles du ciment commercial. Ces derniers dès lors qu'ils sont inclus dans la matrice inorganique gardent toute leur intégrité ainsi que leurs propriétés chimiques respectives. Les études de libérations ont montré que ces ciments combinés permettent d'obtenir une libération contrôlée quelle que soit la molécule active incorporée dans le ciment. Les libérations ont toutes été modélisées sur la base des équations d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas, ce qui nous a permis de montrer que le mécanisme de libération est induit par la diffusion de Fick. Néanmoins, puisque ces analyses ont été effectuées en l'absence de cellules osseuses, il sera important de prendre en compte le phénomène de remodelage osseux induisant l'érosion du biomatériau et favorisant ainsi la libération des principes actifs.

En conclusion, ces CPCs chargés en anesthésiques locaux pourraient être inclus dans un protocole d'analgésie multimodale dans le cadre d'un comblement de la crête iliaque lorsque cette dernière est utilisée comme site donneur lors d'une greffe osseuse autologue.

Partie B : *Influence d'un ciment PCa chargé* en anesthésiques locaux sur la démarche postopératoire et la régénération osseuse

La recherche sur les biomatériaux est un domaine dans lequel les études précliniques chez l'animal sont indispensables. En effet, grâce à ces expérimentations il est possible d'évaluer les performances en termes de repousse osseuse, de dégradation, de résorption et de cytotoxicité du matériau. Il en est de même pour les recherches sur la douleur où ces expérimentations sont l'unique moyen d'évaluer cette « pathologie » puisqu'à l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode alternative. Par conséquent plusieurs modèles animaux ont été développés comme modèle de la douleur dans le but de progresser sur les connaissances de cette dernière. Aujourd'hui, la majorité des connaissances acquises sur les mécanismes de la douleur et l'efficacité des molécules analgésiques sont dues à l'exploitation de ces modèles.

1. Présentation du contexte général

1.1. Choix d'un modèle animal

1.1.1. Description et réglementation

Le modèle animal est décrit selon l'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging comme étant « un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales ». En effet , il est nécessaire, lors de l'étude d'une maladie humaine, que le modèle animal ait une ressemblance suffisante avec l'Homme pour obtenir des résultats transposables.[231] De plus, la connaissance approfondie d'un modèle animal permet de le rendre utile quant à la détermination d'hypothèses liées à la pathogénèse ou à la thérapie d'une maladie.

L'expérimentation animale permet de s'approcher au maximum des conditions d'application clinique finale du produit. Elle est aujourd'hui étroitement réglementée par un ensemble de textes de loi. Le décret n°2013-118 du 1er février 2013 défini les procédures expérimentales comme étant légales uniquement si elles « revêtent un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants susceptibles d'apporter le même niveau d'information ». En pratique, ces études sont régies par la règle des « Trois R ». Aujourd'hui, cette règle est inscrite dans la loi notamment dans la directive européenne 2010/63 qui régit l'expérimentation animale. Élaborée par les zoologistes et microbiologistes Russell et Burch[232] en 1959 elle fut

modifiée en 1983 par le physiologue Zimmermann afin de servir de référence à l'IASP.[233,234] Le concept des Trois R est défini par les termes :

- **Remplacer** le modèle animal par des méthodes alternatives (méthodes in vitro ou in silico) lorsque cela est possible,
- **Réduire** au maximum le nombre d'animaux des essais,
- **Raffiner** la méthodologie appliquée en impliquant la notion de points limites contenant des critères d'interruption des essais. En d'autres termes, la méthodologie utilisée doit être optimisée au niveau des conditions de transport, d'élevage, d'hébergement et d'utilisation. Le but est ainsi de limiter voire d'éviter la douleur et la souffrance subie par les animaux.

Dans le cadre d'un modèle animal comme modèle de la douleur, les guides éthiques proposés par l'IASP appuient sur le fait que l'utilisation d'un animal doit être justifiée par des protocoles élaborés où ces derniers induisent des situations de douleurs similaires entre l'animal et celles présentent chez l'Homme. Cette condition implique alors la nécessité de savoir reconnaître et par la suite quantifier la douleur chez l'animal.

1.1.2. L'animal comme modèle de la douleur chez l'Homme

La douleur chez l'animal est définie comme « une expérience sensorielle aversive qui déclenche des actions motrices protectrices, des apprentissages d'évitement et qui peut modifier le comportement social de l'animal ou du groupe ».[233] Cette expérience diffère de celle de l'Homme définie par l'IASP citée page 33. Chez l'Homme, l'appréhension de la douleur repose majoritairement sur une description subjective et personnelle de cette dernière ; cette auto-évaluation est bien évidemment impossible chez l'animal. De ce fait, il a été mis en place deux concepts pouvant mettre en évidence un processus similaire de douleur entre l'animal et l'Homme. Ces concepts reposent sur (i) la similitude entre l'anatomie nerveuse de l'Homme et de l'animal et (ii) l'anthropomorphisme.

Il a été démontré que les voies de la douleur ainsi que les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de ces derniers chez l'animal étaient assez similaires à ceux de l'Homme. Ainsi, les molécules analgésiques agissant sur des récepteurs précis devraient avoir un fonctionnement équivalent chez Homme et chez l'animal. Nous avons vu précédemment que les douleurs aiguës et chroniques se caractérisaient par plusieurs types (neuropathique, par excès de nociception ou

dysfonctionnelle), qui ne sont, à l'heure actuelle pas toutes appréciables selon la même précision chez l'animal. De plus, la douleur chez l'Homme est une expérience qui s'articule autour des composantes comportementales, sensorielles, émotionnelles et cognitives. En raison de l'absence de la communication verbale chez les animaux, il est donc difficile d'évaluer objectivement les douleurs et en particulier celles dont la valence émotionnelle prédomine. Par conséquent, seule l'étude du comportement permet d'appréhender la douleur chez l'animal et de pouvoir faire un parallèle avec celle de l'Homme. Les types de douleur pouvant être corrélés entre le modèle animal et l'Homme sont les douleurs aiguës et certaines douleurs chroniques. Une autre approche de la similitude entre la douleur humaine et la douleur animale repose sur l'anthropomorphisme.

L'anthropomorphisme est un outil qui consiste à considérer qu'étant donné la ressemblance entre l'anatomie d'un animal et celle d'un Homme, le comportement relatif à la douleur adopté par l'animal dans une situation précise peut être assimilé à celui adopté par l'Homme dans cette même situation. De nombreuses études ont remarqué qu'à partir de stimuli identiques, la réponse vis-à-vis de la douleur était semblable pour les deux espèces.[235] Après l'administration du traitement antalgique, la sensation douloureuse disparut dans les deux cas, ce qui a permis aux auteurs de démontrer l'efficacité de molécules analgésiques à la fois chez l'Homme et chez l'animal.

Pour résumer, la douleur est donc un phénomène complexe dont l'étude implique l'emploi d'un modèle animal.

1.2. Évaluation de la douleur postopératoire in vivo

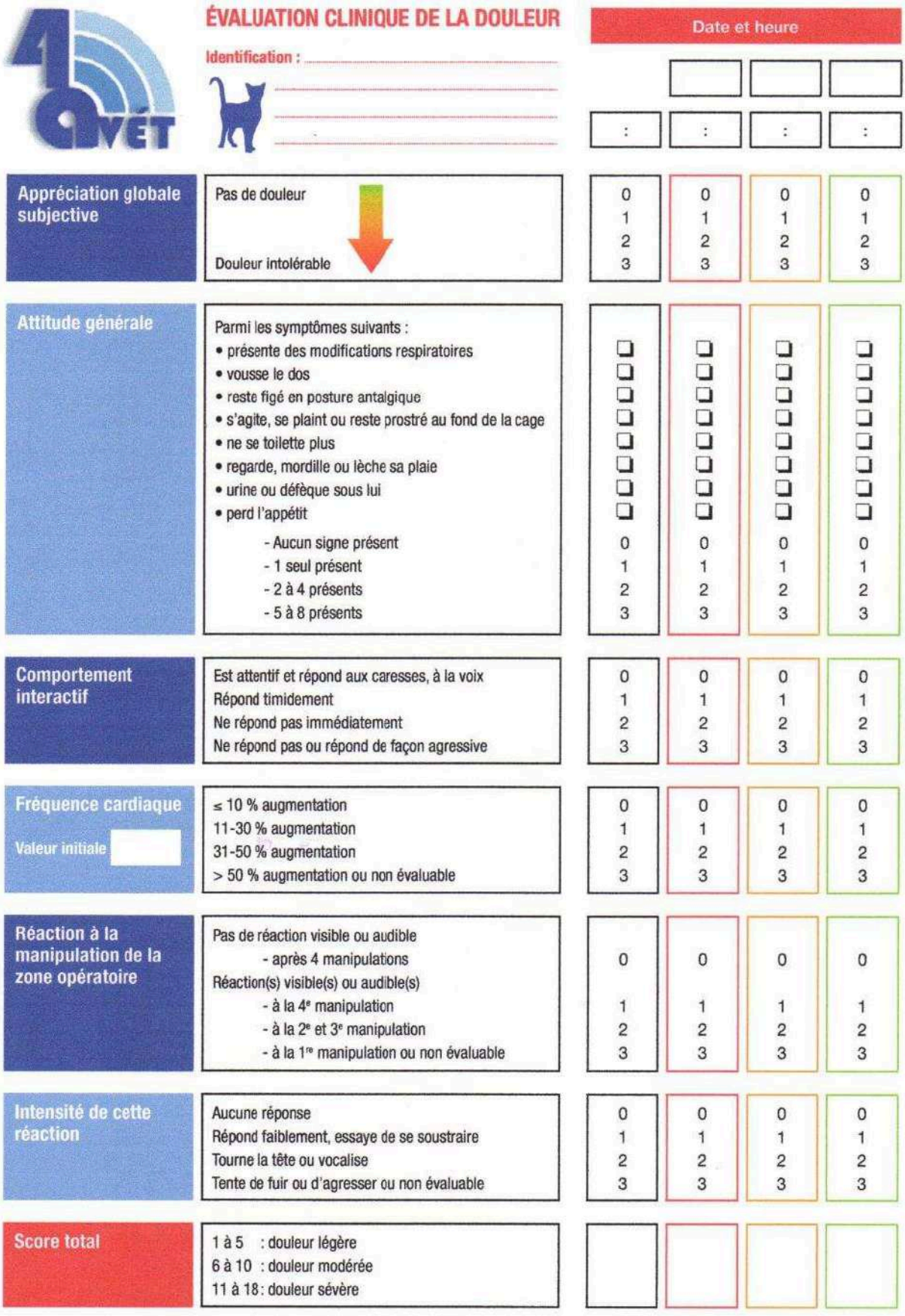
Il existe différentes méthodes permettant d'évaluer la douleur in vivo soit (i) les méthodes visuelles soit (ii) les méthodes reposant sur la sensibilité soit (iii) les méthodes reposant sur l'analyse de la démarche.

1.2.1. Méthode visuelle d'évaluation de la douleur

La méthode visuelle est l'une des premières méthodes utilisée pour l'évaluation de la douleur chez l'animal. Ce procédé repose sur la notation subjective de la douleur sur une échelle graduée par le biais d'une observation rigoureuse du comportement de l'animal.

Au fil des années, ces méthodes n'ont cessé de s'améliorer en prenant en compte de plus en plus de paramètres. Les premières échelles étaient graduées de 0 signifiant l'absence de douleur à 10 représentant une douleur intense. Simple d'utilisation, ces échelles ont pour inconvénient majeur d'être extrêmement subjectives. En 1985, une grille de score multiparamétrique a été développée[236] dans le but d'éviter ce défaut de subjectivité. Ce test, spécifique aux animaux de laboratoire, repose sur l'évaluation de différents paramètres influencés par la douleur tels que, la prise alimentaire, les fréquences respiratoires et cardiaques ou encore le comportement de léchage (Figure 45). Une fois les notations réalisées sur chacun des critères, ces dernières sont additionnées afin d'obtenir une note globale comprise entre 0 (absence de douleur) et 20 (douleur sévère). Considérablement utilisée dans la communauté scientifique, cette grille a été affinée au cours des années dans le but de combler les diverses lacunes dont elle faisait preuve. Il existe d'autres grilles plus caractéristiques de la douleur postopératoire qui s'intéressent notamment au comportement de l'animal face à la plaie chirurgicale et aux réponses qu'engendre la manipulation de cette dernière. L'avantage de telles grilles est la mise en place de valeurs de référence. Ainsi il est possible par la suite de comparer les scores de douleur obtenus à la suite d'une opération chirurgicale ou de l'administration d'un traitement antalgique.[237]

Néanmoins, ces méthodes visuelles comportent deux inconvénients intrinsèques primordiaux soit (i) l'influence directe du comportement des animaux par l'observateur soit (ii) les observations sont « manipulateur-dépendantes ». Ainsi des méthodes alternatives comme l'EthoVision XT (Noldus, Figure 46) ont été inventées dans le but de s'affranchir du premier biais. Ce système consiste à filmer les animaux grâce à une caméra et permet ainsi de suivre leur mouvement, leur activité et leur comportement à distance. De nombreux paramètres tels que la zone analysée, la distance parcourue, l'allure, le cap, les angles de virage et d'autres encore, permettent ainsi de discriminer un animal contrôle d'un animal pathologique. Ceux-ci peuvent être observés sur les cartographies thermiques présentées sur les figures 34 B et C. De plus, cet appareil permet d'acquérir les mouvements des animaux à divers moments que ce soit le jour ou la nuit. L'inconvénient de cette technique est qu'elle requiert énormément de temps pour traiter les vidéos, vu qu'une seule heure d'enregistrement peut nécessiter plusieurs heures d'analyse.[238]



ÉVALUATION CLINIQUE DE LA DOULEUR Identification :		Date et heure			
		:	:	:	:
Appréciation globale subjective	Pas de douleur … Douleur intolérable	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Attitude générale	Parmi les symptômes suivants : • présente des modifications respiratoires • vousse le dos • reste figé en posture antalgique • s'agite, se plaint ou reste prostré au fond de la cage • ne se toilette plus • regarde, mordille ou lèche sa plaie • urine ou défèque sous lui • perd l'appétit - Aucun signe présent - 1 seul présent - 2 à 4 présents - 5 à 8 présents	❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ 0 1 2 3	❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ 0 1 2 3	❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ 0 1 2 3	❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ ❑ 0 1 2 3
Comportement interactif	Est attentif et répond aux caresses, à la voix Répond timidement Ne répond pas immédiatement Ne répond pas ou répond de façon agressive	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Fréquence cardiaque Valeur initiale	≤ 10 % augmentation 11-30 % augmentation 31-50 % augmentation > 50 % augmentation ou non évaluable	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Réaction à la manipulation de la zone opératoire	Pas de réaction visible ou audible - après 4 manipulations Réaction(s) visible(s) ou audible(s) - à la 4e manipulation - à la 2e et 3e manipulation - à la 1re manipulation ou non évaluable	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Intensité de cette réaction	Aucune réponse Répond faiblement, essaye de se soustraire Tourne la tête ou vocalise Tente de fuir ou d'agresser ou non évaluable	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Score total	1 à 5 : douleur légère 6 à 10 : douleur modérée 11 à 18 : douleur sévère				

Figure 45 : Exemple de grille d'évaluation de la douleur postopératoire élaborée par l'association 4A-Vet pour le chat

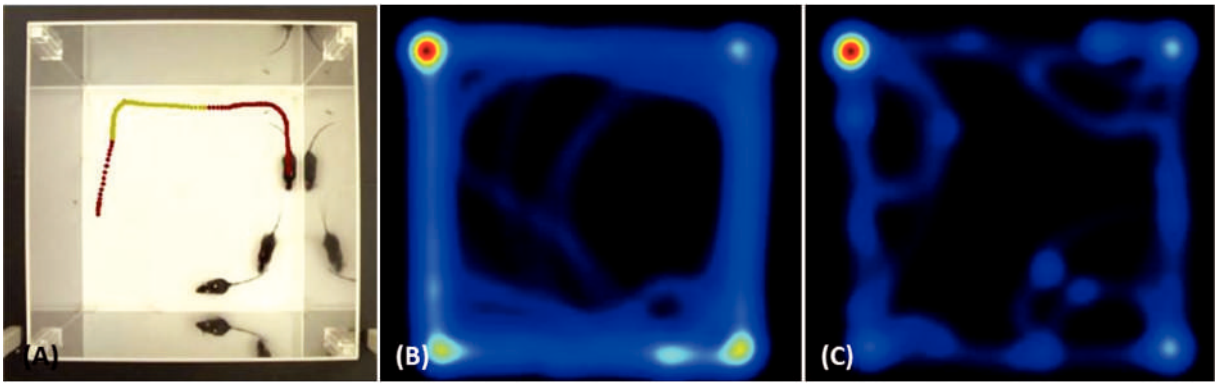


Figure 46: Méthode visuelle de graduation de la douleur. (A) EthoVision™ et cartographies thermiques (B) *d'un animal contrôle et (C) d'un animal pathologique*

Pour résumer, les méthodes visuelles de graduation sont considérées comme suffisantes pour ce qui est de l'évaluation de la douleur et permettent d'assurer la détection des « points limites ». Malgré cela, elles restent toutefois trop subjectives et imprécises pour être utilisées seules dans une recherche expérimentale sur la douleur.

1.2.2. Méthodes reposant sur une mesure de sensibilité

Ces tests reposent sur la mesure de la réponse d'un animal face à l'application localisée d'un stimulus quelle que soit sa nature. Ce dernier peut ainsi être mécanique (comme le test de Von Frey, Figure 47), thermique (comme le test de Hargreaves), électrique ou même chimique (comme le test d'injection de formol).[239] En pratique, un stimulus est appliqué à l'animal et maintenu pendant quelques secondes. Par exemple, le test de Von Frey utilise un filament appliqué sous la surface plantaire de la patte postérieure (Figure 47). Si l'animal ne réagit pas, un stimulus d'une intensité supérieure est alors apposé et ce, jusqu'à ce que l'animal ait une réponse face au stimulus appelé seuil de sensibilité. Plus le seuil est bas et plus la zone testée est sensible. Ce type de méthode met particulièrement bien en évidence les phénomènes d'hyperalgésies primaire ou secondaire.[240]

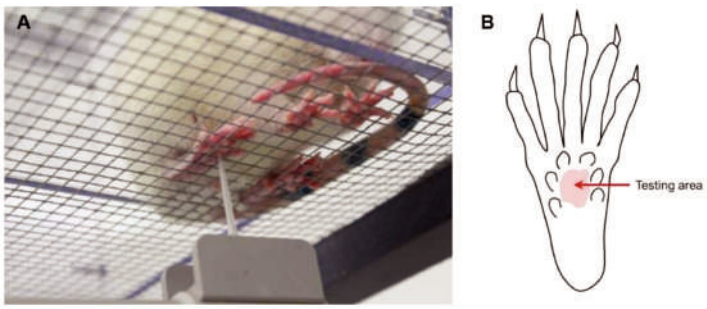


Figure 47 : Application de la pointe *du Von Frey sur la patte arrière d'un* rat (A) et localisation de la zone testée (B)[241]

Pour que le test soit défini comme valide, le stimulus doit être non invasif, quantifiable et reproductible,[242] ainsi l'intensité, la durée et la surface de test doivent être contrôlées. La peau est le tissu le plus couramment utilisé. Ce site est un élément primordial à prendre en compte puisque la sensibilité cutanée peut différer entre l'Homme et l'animal. L'historique du site d'application est également à prendre en compte. En effet, les tests réalisés sur des tissus sains peuvent par leur répétition léser le site et entacher les résultats. Ces évènements ne doivent donc en aucun cas arriver. Pour finir, la nature du stimulus détermine le nombre de répétitions appliqué pendant un temps donné.

Ces méthodes permettent d'étudier les mécanismes en jeu dans les douleurs de type aigu et chronique. Elles sont également utilisées dans l'étude de l'efficacité de molécules analgésiques. En effet, ces molécules grâce à leur capacité de blocage de l'influx nerveux vont augmenter le seuil de sensibilité et par conséquent allonger le temps de réponse au stimulus douloureux.[243] Leurs avantages résultent dans le fait qu'elles permettent d'augmenter la précision vis-à-vis de la douleur ressentie par l'animal et de s'affranchir de la subjectivité que possèdent les méthodes visuelles. Cependant, elles possèdent également des inconvénients comme des protocoles parfois compliqués à mettre en place et comme le fait d'être invasives. De plus, toutes les affections engendrant de la douleur ne peuvent pas toutes être évaluées par ces méthodes puisqu'une maladie entraînant une défaillance motrice peut engendrer l'incapacité de l'animal à répondre au stimulus (comme l'ostéoarthrite).

1.2.3. Méthodes reposant sur la démarche

Pour remédier aux inconvénients des affections engendrant la défaillance de motricité, des méthodes reposant sur l'analyse de la marche ont été développées dans l'étude de la douleur. En effet, de nombreuses études ont montré, chez l'Homme, une corrélation entre la modification de la démarche et différents types de douleur. Par exemple, les personnes touchées de polyarthrite rhumatoïde, du fait de la douleur, modifient leur appui en limitant ce dernier sur les avant-pieds. Par conséquent, leur cycle de marche comprend une foulée sensiblement plus courte par rapport à celle d'un cycle normal. La vitesse de la marche est également altérée par cette maladie.[244] D'autres cas sont rencontrés tels que des patients ayant une arthrose du genou qui ont tendance à compenser sur le genou moins endommagé. Ainsi, ce changement de démarche aboutit à l'aggravation de l'arthrose existante aux articulations adjacentes au genou.[245]

On peut distinguer deux domaines dans l'analyse de la marche :

- L'analyse cinématique,

  Elle s'attache exclusivement à décrire la qualité de la marche dans le temps, sans se préoccuper des causes engendrant la modification de cette dernière. C'est une analyse temporelle et spatiale des mouvements successifs du bassin, des hanches, des genoux et des chevilles. Elle inclut également les aspects de vitesse.

- L'analyse dynamique ou cinétique.

  Elle étudie les forces mises en jeu lors de la marche, c'est-à-dire celles issues des articulations et de la voûte plantaire.

Historiquement séparées, ces analyses sont aujourd'hui étudiées conjointement à l'aide de dispositifs permettant leur évaluation en simultanée.

Dans un premier temps, les premières plateformes de force étaient développées sous la forme de chaussures pneumatiques permettant la mesure de la pression verticale exercée par le pied lors de la marche.[246] Par la suite, d'autres plateformes plus perfectionnées ont été inventées. Traditionnellement composées d'une plaque de verre sur laquelle le patient marche, ces dernières sont capables de mesurer toutes les composantes directionnelles de la force du pied engendrées par sa réaction avec le support grâce à de multiples capteurs de pression.

Chez l'animal, des appareils similaires ont été développés mais plus tardivement. À l'origine, la démarche d'un animal était mesurée grâce à l'application d'encre sous ses pattes puis en le faisant marcher sur un papier blanc.[247] Cette technique comprend de nombreux désavantages comme le fait que ce soit une analyse cinématique de la marche dont le nombre de paramètres exploitables est extrêmement réduit. Les tracés obtenus sont quelques fois imprécis et difficiles à interpréter et en plus de cela, la préhension de l'animal peut engendrer une hausse de son stress. Actuellement, l'analyse cinématique de la marche de l'animal est étudiée à l'aide de dispositifs plus performants, fiables et plus simples comme le DigiGait™ (Mouse Specifics, Inc., Figure 48 A) ou le TreadScan™ (CleverSys, Inc.).[248]

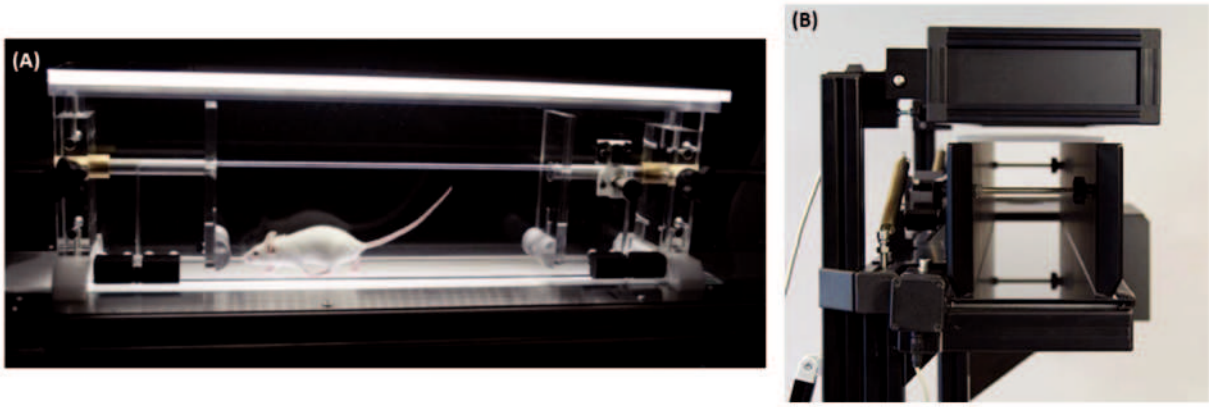


Figure 48 *: Analyse de la marche d'un rat selon différents dispositifs. (*A) DigiGait™ vue de face et (B) CatWalk™, intérieur du couloir vue de profil

Il existe d'autres appareils qui ont été développés afin de réaliser une étude combinée (cinématique et dynamique) de la marche. Ces dispositifs sous forme de tapis roulants (tels que les Panlab Treadmills™) ou de plateformes (comme le CatWalk™ XT de Noldus, Figure 48 B) ont été conçus et adaptés à plusieurs espèces d'animaux et dont certains spécialement aux rongeurs.[249,250]

Au cours de la dernière décennie, le système d'analyse CatWalk[251,252] a été démontré comme une méthode valable et non invasive permettant l'évaluation de la douleur chronique.[253] Elle s'est avérée être une méthode fiable pour déterminer l'apparition ou le caractère continu d'une maladie grâce à un protocole basé sur la modification de la démarche. Le CatWalk XT a été validé pour des procédures expérimentales sur les rongeurs afin d'étudier de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives,[254] les inflammations myofasciales,[255] les lésions nerveuses périphériques,[256,257] l'arthrose[258,259] et les traumatismes.[260] Cette méthode analyse la marche grâce à un suivi vidéo et fournit une analyse complète des paramètres spatio-temporels de chaque empreinte de patte ainsi que des modèles dynamiques de coordination inter-membres. Cette technique fait partie intégrante de cette étude et sera par la suite détaillée de manière plus approfondie.

L'étude qui suit repose sur l'évaluation de l'efficacité analgésique de nos dispositifs combinés via l'analyse de la démarche. L'objectif est alors de fournir une évaluation fonctionnelle du soulagement de la douleur lié à l'injection de CPCs chargés en anesthésiques locaux (bupivacaïne, levobupivacaïne ou ropivacaïne) et de la comparer avec celle obtenue dans le cas d'un comblement avec le ciment contrôle. La réponse tissulaire sera également étudiée.

2. Création d'un défaut critique

2.1. Modèle animal

Toutes les procédures animales ont été approuvées par les comités institutionnels de protection des animaux (protocole Apafis n° 5270) et ont été menées conformément aux lignes directrices européennes pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63 /UE). Le protocole a été établi à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS) par la plateforme de chirurgie expérimentale et réalisé à la Faculté de Médecine de Nantes dans l'Unité Thérapeutique Expérimentale (UTE). Deux expérimentations animales ont été réalisées pour ce projet, la première en 2015 et la seconde en 2016.

La première étude comprenait un lot de 20 rats Wistar femelles et la seconde un lot de 30 rats Wistar femelles, provenant du laboratoire Charles River. Tous les rats ont été reçus à un âge de 6 semaines en début d'expérimentation avec un poids compris entre 225 et 250 g. Lors de l'arrivée à l'animalerie, les animaux ont été groupés par 2 ou 3 et une semaine de quarantaine a été nécessaire pour leur acclimatation. Pendant toute la période expérimentale, les animaux ont eu un accès illimité à la nourriture et à l'eau. Des cycles de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité ont également été respectés. Pour la suite de l'analyse, les deux expérimentations seront séparées et seront référencées selon les dénominations suivantes :

- CAAPRO 1 pour la première étude,
- CAAPRO 2 pour la deuxième étude.

2.2. Modèle chirurgical

Le but de l'étude a été de créer un défaut osseux de taille critique dans la partie distale du fémur droit du rat. Ce défaut osseux doit être assez large pour ne pas cicatriser spontanément, mais assez fin pour ne pas provoquer une fracture du fémur.

La procédure chirurgicale a été menée sous anesthésie générale induite à l'aide d'un mélange d'isoflurane et d'oxygène délivré dans une chambre d'induction et maintenu à travers un masque nasal individuel pendant toute la durée de l'opération (30 min). Une fois endormis, les rats ont reçu une injection sous-cutanée de 0,05 $mg.kg^{-1}$ de chlorhydrate de buprénorphine (Buprecare®, Cooper) comme analgésie préventive. Les animaux ont alors été pesés et la zone chirurgicale a été tondue (membre inférieur droit) puis désinfectée par des passages successifs d'une solution de Bétadine .

L'intervention chirurgicale s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord il a été nécessaire d'inciser la peau et les muscles peauciers sur la face latérale du genou droit. Ensuite, les muscles ont été positionnés de manière à libérer l'accès à la capsule articulaire. Cette dernière a été incisée dans le but de luxer la patelle. Un défaut osseux cylindrique de taille critique (3,1 mm Ø et 5 mm de profondeur, Figure 49 A) a été créé dans le condyle fémoral latéral de la patte postérieure droite de chaque animal à l'aide de matériels d'odontologie adéquats (forets et fraise).

Figure 49 : Implantation de ciment. (A) Création d'un défaut cylindrique de taille critique, (B) Injection du ciment, (C) Défaut rempli avant la fermeture de la plaie

Après l'hémostase et le séchage de la cavité osseuse, la cavité artificiellement créée a été remplie doucement avec le ciment phosphocalcique contrôle ou chargé en anesthésique local (Figure 49 B). Le CPC a ensuite été tassé pour éviter la formation d'espaces vides qui fragiliseraient le substitut (Figure 49 C) et l'excédent de ciment a été délicatement retiré à l'aide d'une compresse humide. Pour finir, la capsule et les muscles ont été suturés par des points séparés en X et la peau par des points séparés en U. La zone opérée a alors été désinfectée de nouveau selon le même protocole, puis les rats ont été réveillés par arrêt de l'isoflurane, et isolés dans une cage propre le temps de leur réveil (15 min). Le membre controlatéral a été laissé intact. Toutes les interventions chirurgicales ont été effectuées à l'aveugle, c'est-à-dire que le chirurgien ignorait la nature du ciment injecté.

Après l'intervention, un examen chimique a été effectué deux fois par jour par un contrôle visuel du site chirurgical et la mesure du diamètre du genou afin d'évaluer la présence potentielle d'un hématome, d'un œdème, d'un gonflement ou d'une intolérance au biomatériau injecté. Si nécessaire, une injection supplémentaire de chlorhydrate de buprénorphine (0,05 $mg.kg^{-1}$) pouvait être administrée.

Les animaux ont été sacrifiés trois semaines et trois mois après l'implantation (pour la première et la seconde expérimentation respectivement), par injection intracardiaque d'un surdosage de pentobarbital sodique (Doléthal®, Vétoquinol) conduite sous anesthésie générale.

Un récapitulatif des deux expérimentations CAAPRO 1 et CAAPRO 2 est présenté ci-dessous dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Récapitulatif *des différents groupes d'animaux avec les conditions d'implantations*

	CAAPRO 1	**CAAPRO 2**
Nombre d'animaux	20	30
Délai d'implantation	3 semaines	3 mois
CPC*	Oui	Oui
Bupi-CPC*	Oui	Oui
Ropi-CPC*	Oui	/
Levo-CPC*	/	Oui
Défaut critique non comblé*	/	Oui
Contrôle non opéré*	/	Oui

*Les animaux ont été assignés aléatoirement dans chaque groupe et N=6 par groupe.

3. Analyse fonctionnelle de la démarche

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Le système CatWalk : présentation

L'efficacité de l'analgésie et la récupération fonctionnelle qui en résulte doivent être évaluées aussi objectivement que possible. Dans ce but, nous avons considéré l'analyse de la démarche comme étant la méthode la plus adéquate. Ainsi, l'objectif est de fournir une évaluation fonctionnelle du soulagement de la douleur fourni par l'implantation d'un CPC combiné avec un anesthésique local (bupivacaïne, levobupivacaïne ou ropivacaïne). Ces derniers seront également comparés à la démarche obtenue dans le cas d'un comblement avec le CPC contrôle.

3.1.*1.1. Principe de l'analyse CatWalk*

L'analyse de la démarche postopératoire a été réalisée à l'aide du système CatWalk™ XT (Noldus). Ce système, développé par le hollandais Franck Hamers à l'Institut Rudolph Magnus de Neurosciences aux Pays-Bas, permet le parcours libre d'un rongeur à travers une plateforme dont la longueur et la largeur sont ajustables. Divers paramètres relatifs à ses appuis sont alors obtenus.

Le système comprend quatre éléments (Figure 52):

- **Un couloir** d'une longueur de 1 m et d'une largeur ajustable. Celui-ci permet de diriger et de limiter la liberté de mouvement des rongeurs à une ligne droite au travers de la passerelle. Le plafond lumineux émet une lumière rouge permettant d'observer le contour de l'animal dans les enregistrements et facilite (Figure 50), ainsi, la reconnaissance des membres,

Figure 50 *: Image d'un rat* vu du dessous dans le système Catwalk

- **Un plancher en verre trempé** de 5 cm d'épaisseur et traversé d'une lumière verte permettant l'observation des empreintes. En effet, lorsqu'aucun animal ne traverse l'appareil, le rayon lumineux se propage d'une extrémité à l'autre du verre sans perte en empruntant un parcours en zigzag. En revanche, quand les pattes d'un animal touchent le verre, la lumière est réfractée vers la caméra située sous la plaque de verre. L'empreinte observée est alors donnée par la Figure 51 A.

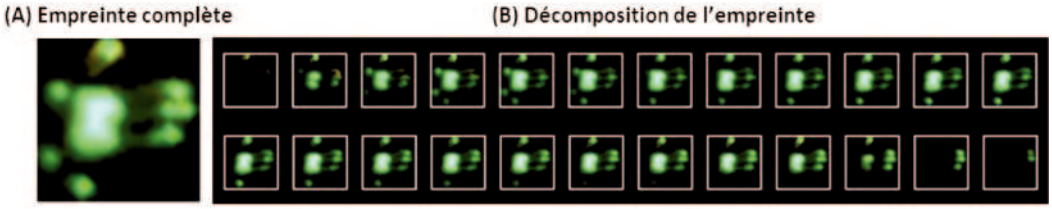


Figure 51 : *Empreinte d'une patte arrière d'un rat sous la forme (A) complète et (B)* décomposée.

- **Une caméra couleur haute vitesse** située sous le couloir permet une acquisition des données avec une résolution spatiale et temporelle extrêmement précise. Une empreinte est ainsi composée d'une multitude d'images successives (Figure 51 B). De plus, sa hauteur ajustable donne la possibilité de moduler la longueur d'étude du couloir,

- **Un logiciel** d'analyse CatWalk^{TM}10.6 qui permet l'enregistrement des vidéos ainsi que le tri, la classification et l'analyse de la démarche des animaux.

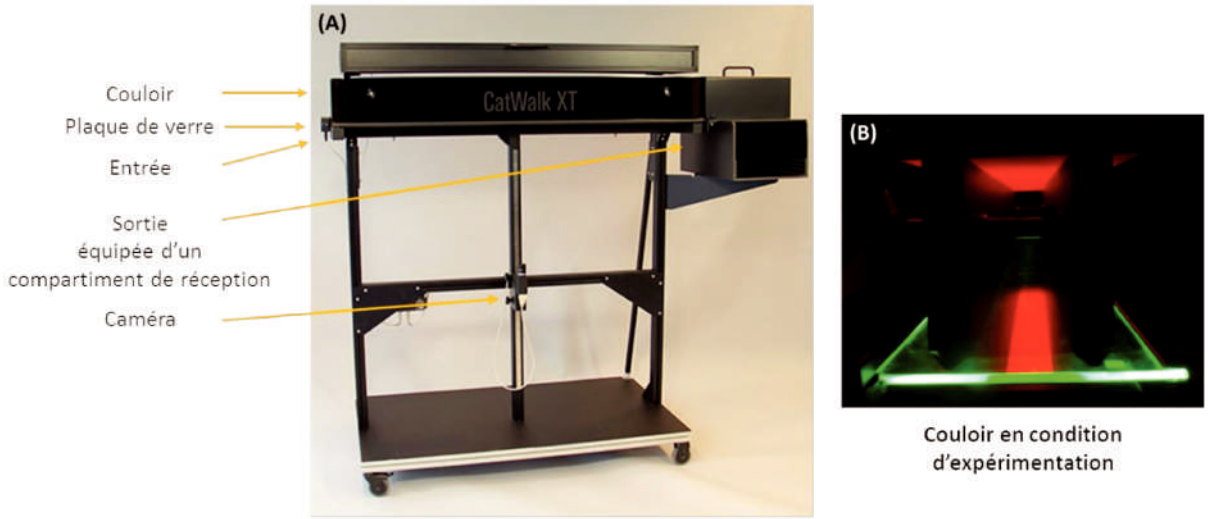


Figure 52 : Appareillage du système Catwalk™ XT (A) Entier vue de face et (B) Couloir vue de profil *en condition d'expérimentation*

3.1.1.2. Procédure analytique

Tout d'abord la largeur du couloir du Catwalk a été réglée sur 8 cm et la hauteur de la caméra a été fixée dans le but d'obtenir une largeur et une longueur d'acquisition respectivement de 7,7 cm et de 42,4 cm, permettant d'enregistrer 6 foulées au maximum.

L'analyse de la démarche a été réalisée d'après le protocole suivant. Deux semaines avant l'intervention chirurgicale, les animaux ont été habitués puis entraînés quotidiennement à marcher à travers le tunnel. Une fois les animaux opérés, les analyses Catwalk ont été effectuées à différents temps selon les expérimentations. Pour CAAPRO 1, les analyses ont été réalisées à t = 2, 4, 6, 24, 72, 168 et 336 h postopératoires. Tandis que pour CAAPRO 2, les analyses ont été faites à t = 6, 24, 72, 96 h et t = 1, 2, 3, 4 semaines postopératoires. L'injection du biomatériau lors de la chirurgie a été désignée comme t = 0 h.
Tout comme la chirurgie, les expériences d'analyse de la marche ont été menées à l'aveugle.

De plus, dans le cas de la première expérimentation, dans le but de limiter la variabilité inter animal, les derniers essais avant l'intervention chirurgicale ont été considérés comme la valeur de référence. Chaque rat opéré sera alors son propre contrôle.

3.1.1.3. Les paramètres

Les paramètres ont été acquis selon les critères de conformités suivants soit (i) une durée de parcours comprise entre 1 et 5 sec (ceux excédant cette dernière valeur sont automatiquement annulés) soit (ii) une variation de vitesse maximale de 80 %. Les parcours comportant de longs arrêts, des traces de reniflages ou d'excréments sont également rejetés pendant la phase d'acquisition par l'opérateur. Un minimum de cinq essais conformes est nécessaire afin d'effectuer une analyse statistique adéquate. Dans la plupart des cas, les cinq ou six premiers essais ont produit les cinq essais conformes. De plus, le nombre de passages est limité afin d'éviter l'épuisement des animaux.

Les parcours enregistrés sur le système Catwalk permettent l'analyse d'une grande variété de paramètres, soit jusqu'à 280 paramètres bruts. Certains d'entre eux tiennent compte d'une seule patte alors que d'autres sont reliés à la position des empreintes et permettent l'étude de la coordination de l'animal. Il est possible de classer les paramètres obtenus selon trois groupes (Figure 53):

- Les paramètres spatiaux,
- Les paramètres temporels,
- Les paramètres d'intensité.

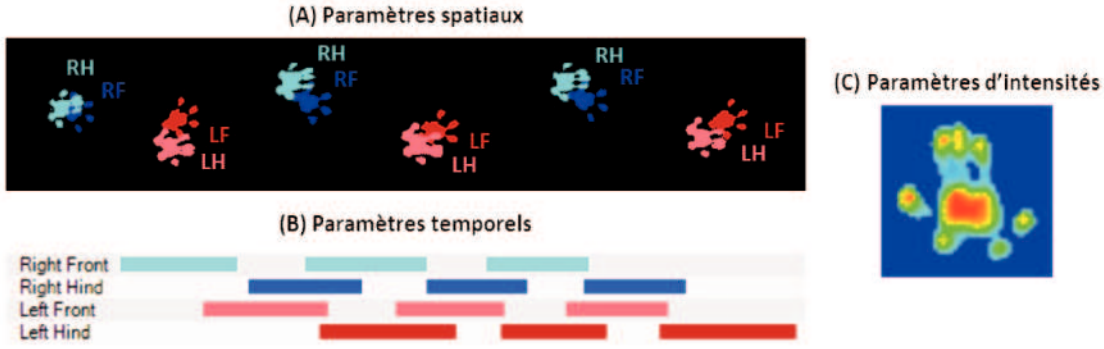


Figure 53 : Exemple des différents paramètres du système Catwalk avec (A) une représentation spatiale des empreintes avec les empreintes des pattes gauches (rouge), les pattes droites (bleu), les membres postérieurs (couleurs claires) et les membres antérieurs (couleurs foncées), (B) une représentation temporelle de la marche et (C) une *visualisation d'u*ne empreinte de patte arrière droite représentée en échelle d'intensité

Les Tableau 15, 16, 17 et 18 présentent les 29 paramètres relatifs à un membre ainsi que 2 paramètres de coordination. Il est à noter que le logiciel Catwalk 10.6 est en anglais, nous avons donc choisi de garder les noms des paramètres dans cette langue. Il en est de même pour les pattes qui seront référencées de cette manière : patte arrière droite (Right Hind : RH), patte arrière gauche (Left Hind : LH), patte avant droite (Right Front : RF) et patte avant gauche (Left Front : LF).

Tableau 15 : Résumé des paramètres spatiaux du CatWalk

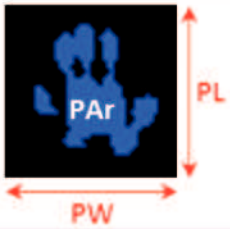
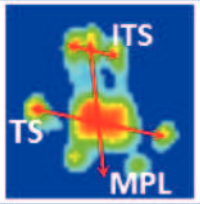
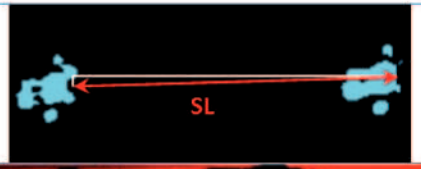
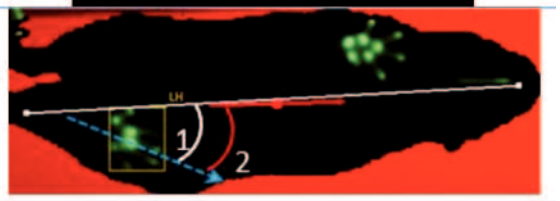
Paramètres spatiaux		
Print Area, PAr (cm²)	Surface de l'empreinte complète	
Print Length, PL (cm)	Longueur de l'empreinte complète	
Print Width, PW (cm)	Largeur de l'empreinte complète	
Manual Print Length, MPL (cm)	Distance entre le centre du 3ème orteil et le talon d'une patte arrière	
Intermediate Toe Spread, ITS (cm)	Distance entre le 2nd et le 4ème orteil d'une patte arrière	
Toe Spread, TS (cm)	Distance entre le 1er et le 5ème orteil d'une patte arrière	
Max Contact Area (cm²)	Surface de l'impression au contact Max	
Stride Length, SL (cm)	Longueur de la foulée représentée par la distance entre les placements successifs de la même patte.	
Paw Angle Body Axis (°)	Angle entre la ligne directrice provenant du manual print length et la ligne blanche représentant l'axe du corps de l'animal (1)	
Paw Angle Movement Vector (°)	Angle entre la ligne directrice provenant du manual print length et la ligne rouge représentant la direction du mouvement de l'animal (2)	

Tableau 16 : Résumé des paramètres temporels du CatWalk

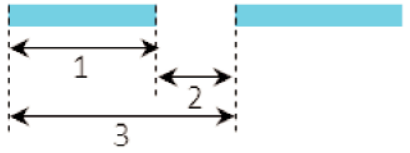
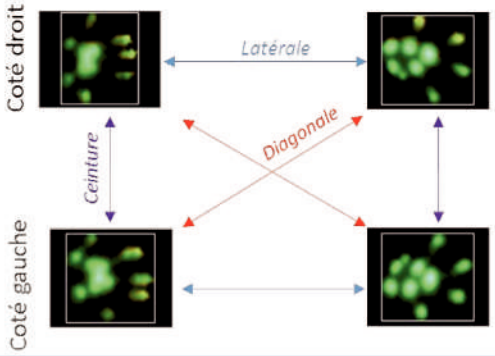
Paramètres temporels		
Stand (s)	Durée de contact d'une patte avec la plaque de verre (1)	
Swing (s)	Durée de non contact d'une patte avec la plaque de verre (2)	
Step Cycle (s)	Durée entre deux poses consécutives de la même patte (3) : $\text{Stand} + \text{Swing}$	
Duty cycle (%)	Phase de travail d'une patte : $\frac{\text{Stand}}{\text{Step cycle}} \times 100$	
Single Stance (s)	Partie dans le cycle d'une patte où la patte controlatérale ne touche pas la plaque de verre (2)	
Initial Dual Stance (s)	1ère fois dans un cycle d'une patte où la patte controlatérale est également en contact avec la plaque de verre (1)	
Terminal dual stance (s)	2ème fois dans un cycle d'une patte où la patte controlatérale est également en contact avec la plaque de verre (3)	
Swing speed (cm/s)	Vitesse de la patte pendant le swing : $\frac{\text{Stride length}}{\text{Swing}}$	
Stand index (u.a.)	Mesure de la vitesse lorsque la patte perd le contact avec la plaque de verre	
Max Contact At (s)	Temps depuis le début de la course où la plus grande partie de l'empreinte est en contact avec la plaque de verre	
Body Speed (cm/s)	Vitesse du corps de l'animal : $\frac{\text{Stide length}}{\text{Step cycle}}$	
Body Speed Variation (%)	$\frac{\text{Body Speed}}{\text{Vitesse moyenne}} \times 100$	

Tableau 17 : Résumé des paramètres *d'intensités* du CatWalk

Paramètres intensités		
Intensity (u.a)	Intensité moyenne de la patte complète.	L'intensité dépend du degré de contact entre une patte et la plaque de verre, varie de 0 à 255 et est convertie en échelle de couleur du vert au rouge
Max intensity (u.a)	Intensité maximale de la patte complète	
Max Contact Intensity (u.a)	Intensité moyenne au contact maximal d'une patte	
Max Contact Max Intensity (u.a)	Intensité maximale au contact maximal d'une patte	
Max Intensity At (%)	Max Contact At (s) par rapport au stand : $\frac{\text{Max intensity at (s)} \times \text{Initial contact}}{\text{Stand}} \times 100$	
Min Intensity (u.a)	Intensité minimale de la patte complète	
Intensity Of The 15 Most Intense Pixel (u.a)	Intensité moyenne des 15 pixels d'intensité maximale d'une patte	

Tableau 18*: Paramètres d'évaluation de la coordination*

Paramètres d'évaluation de la coordination		
Regularity index (RI)	Indice de régularité : $\frac{NSSP \times 4}{PP} \times 100$ Avec NSSP : le nombre séquence normal de pas et PP : le nombre de pas. Si l'animal marche « normalement », la valeur du RI est de 100 %	
Base of Support	Durée relative du contact simultané de toutes les combinaisons de pattes avec la plaque de verre. Les combinaisons existantes sont : ▪ Zéro patte, ▪ Une seule patte, ▪ Deux pattes (i) diagonales, (ii) latérales ou (iii) ceintures, ▪ Trois pattes, ▪ Quatre pattes.	

Pour chaque animal, la moyenne (± écart-type) des 5 essais conformes a été calculée pour chaque paramètre sélectionné. Les valeurs moyennes ont ensuite été calculées pour les groupes d'animaux implantés par les différents ciments (contrôle et chargés en anesthésique local). Les paramètres relatifs à la démarche ont été comparés entre le CPC et les CPCs chargés en anesthésiques locaux en utilisant des analyses de variance, ANOVA. Lorsque des effets significatifs ont été trouvés, le test de Fischer a été utilisé pour des comparaisons intergroupes. Chaque fois que nous avons observé une différence significative entre deux groupes, le F-test associé a été vérifié comme étant positif. Le seuil de significativité a été fixé à 99 % ($p < 0,01$).

Sur la base des propriétés attendues des CPCs testées, les paramètres ont été étudiés tout d'abord sur la patte opérée seule, puis sous la forme d'un parallélisme avec la patte controlatérale et enfin sur la variation de la coordination. Les limites du protocole et de l'appareillage seront également présentées. Le Tableau 19 récapitule ces études en fonction de l'expérimentation réalisée.

Tableau 19 : Résumé des études en fonction des expérimentations effectuées

Étude	Expérimentation
Membre opéré	CAAPRO 1
Parallélisme membre opéré/membre controlatérale	
Coordination	
Avantages & limites	CAAPRO 1 & CAAPRO 2

3.2. Résultats et discussions

3.2.1. Influence sur un membre opéré

Afin de démontrer de potentielles modifications au niveau du membre opéré, quatre paramètres de la démarche ont été sélectionnés : la surface de l'empreinte (print area), l'intensité (intensity), la longueur de l'empreinte prise manuellement (manual print lenght) et la phase de travail d'une patte (duty cycle). Ensemble, ces paramètres permettent d'illustrer la réponse à un stimulus douloureux à l'aide d'observations de différences significatives pendant la période postopératoire. Les résultats de chaque paramètre sont présentés sous forme de graphique où les valeurs ont été recalculées en pourcentage par rapport à la ligne de base.

La Figure 54 A représente l'évolution du paramètre print area pendant la période postopératoire. Tout d'abord, lors de l'implantation du CPC, il est possible d'observer que ce paramètre diminue de 107 ± 4 □ (surface préopératoire) jusqu'au minimum 33 ± 3 % à 24 h

postopératoires. Par la suite, la print area augmente progressivement jusqu'à une valeur finale de 86 ± 3 % à 14 jours. En comparaison, lors de l'utilisation des ciments chargés en anesthésiques locaux, une diminution de la print area est également observable dans les premières heures postopératoires et le retour vers la valeur de référence (100 %) est observé plus rapidement. À 24 heures postopératoires, la modification de la démarche a atteint son niveau le plus élevé pour les rats traités avec le CPC, il est possible de distinguer que les rats traités avec les Ansth-CPCs ont une print area significativement plus élevée ($p < 0,01$) que les rats traités avec le CPC soit 76 ± 3 % pour le Bupi-CPC et 59 ± 3 % pour le Ropi-CPC. Ceci est observable sur la Figure 54 B qui représente la print area des rats opérés en fonction des différentes conditions d'implantation à 24 h postopératoires. De plus, les deux Ansth-CPCs sont également différenciés puisque le Bupi-CPC montre une print area significativement plus élevée que celle du Ropi-CPC à ce moment-là et ce jusqu'à 48 h postopératoires. Finalement, à 7 jours postopératoires, la print area des rats implantés avec le Bupi-CPC n'est plus significativement différente de la ligne de base préopératoire. La print area fournie par le Ropi-CPC revient à la valeur de référence à 14 jours alors que celle du CPC reste encore inférieure à la référence.

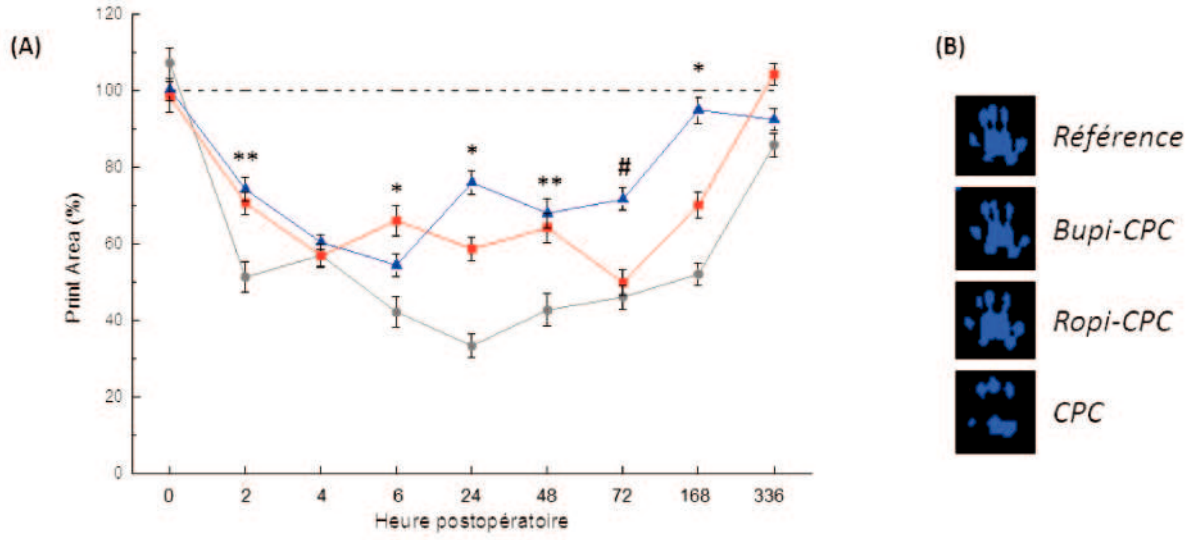


Figure 54: Print area (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* $p < 0,01$ Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** $p < 0,01$ Ansth-CPCs vs CPC, # $p < 0,01$ Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires

Le paramètre intensity et le paramètre print area montre des variations similaires, c'est-à-dire que *l'intensity* de l'empreinte diminue jusqu'à atteindre un minimum à 24 h et réaugmente par

la suite. À 24 heures postopératoires (Figure 55), l'intensity est réduite de 23 ± 2 % et 7 ± 2 % pour le CPC et le Ropi-CPC respectivement par rapport à la ligne de base. En revanche, aucune modification n'est observée pour les rats traités avec du Bupi-CPC. De plus, les différences notées entre les trois ciments à 24 h postopératoires sont également significatives ($p < 0,01$). À 48 heures postopératoires, le CPC présente une intensity significativement plus faible (79 ± 2 %) que les deux Ansth-CPCs (96 ± 2 % pour Ropi-CPC et 100 ± 2 % pour Bupi-CPC). Il est à noter que pendant toute la période d'évaluation, *l'intensity* fournie par le Bupi-CPC n'est pas significativement différente de la référence. À la fin de la période d'évaluation (14 jours), *l'intensity* fournie par le CPC et le Ropi-CPC revient à la valeur de référence.

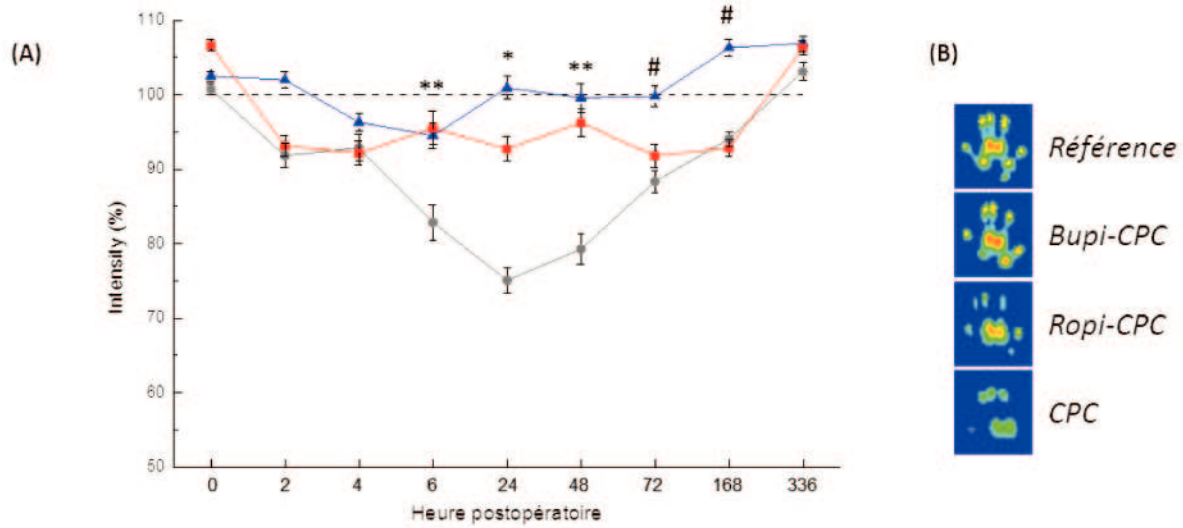


Figure 55 : Intensity (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* $p < 0,01$ Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** $p < 0,01$ Ansth-CPCs vs CPC, # $p < 0,01$ Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires

Comme le paramètre print area, le paramètre manual print length diminue après la chirurgie. La manual print length est de 71 ± 2 % à 24 heures (Figure 56) pour le CPC, tandis que pour le Bupi-CPC et le Ropi-CPC, elle est respectivement de 90 ± 2 % et de 87 ± 2 %. Cette différence est significative ($p < 0,01$) par rapport au CPC mais sans différence notable entre les deux Ansth-CPCs. À 7 jours postopératoires, ce paramètre n'est plus significativement différent de la ligne de base préopératoire pour les deux Ansth-CPCs.

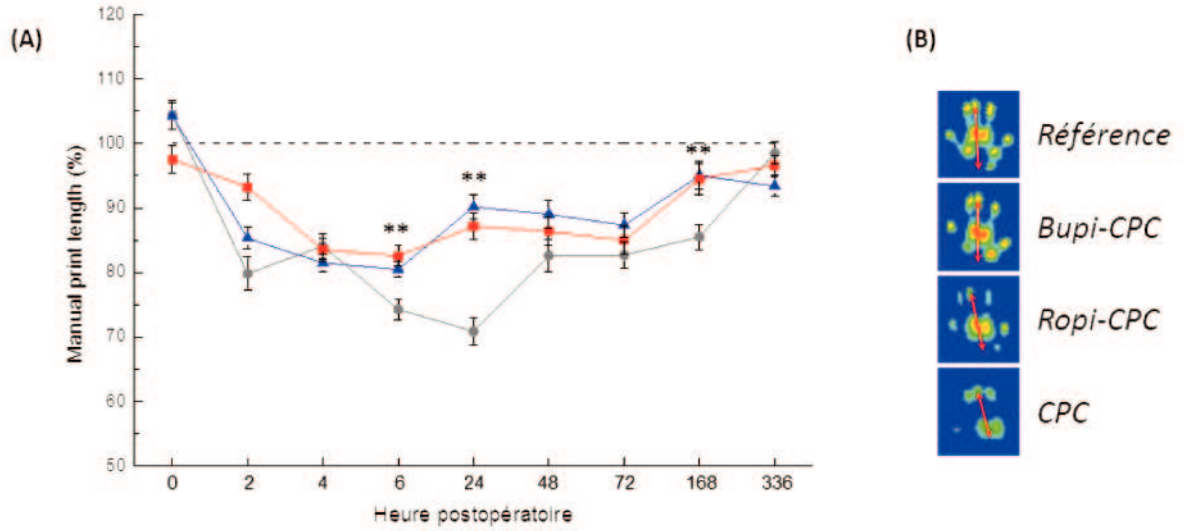


Figure 56 : Manual print length (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires

Le paramètre duty cycle (Figure 57) ne présente pas de variation significative entre les Ansth-CPCs et la ligne de base pendant toute la période d'implantation. À l'inverse, pour le CPC, ce paramètre diminue après l'opération avec une différence significative (p < 0,01) entre le CPC (83 ± 2 %) et les Ansth-CPCs (95 ± 2 % pour la ropivacaïne et 98 ± 2 % pour la bupivacaïne) à 24 heures postopératoires. À partir 48 heures postopératoires, plus aucune différence significative n'est observée entre tous les ciments et le duty cycle de marche revient progressivement à la normale.

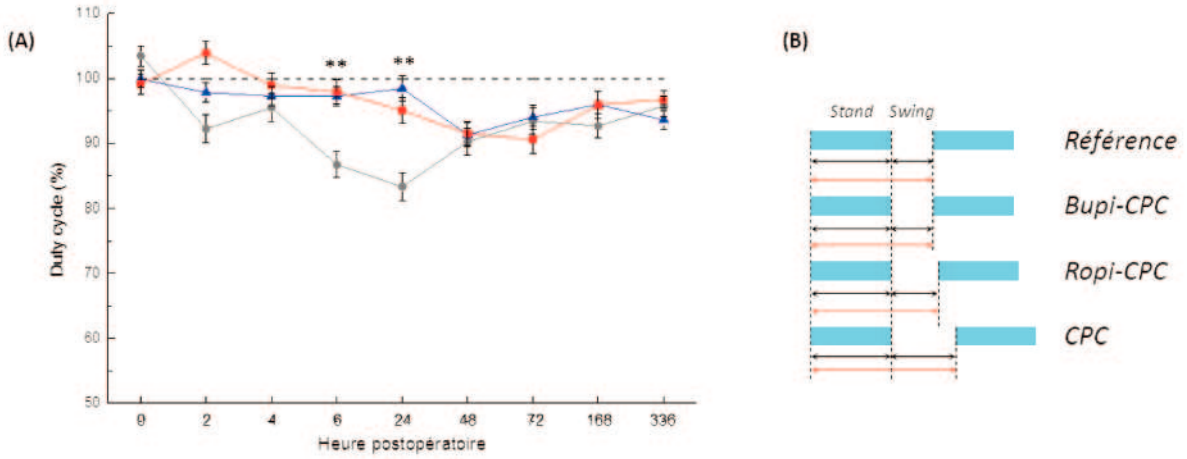


Figure 57: Duty Cycle (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires

Les paramètres choisis présentent un grand intérêt pour l'analyse de la marche puisqu'ils correspondent à la fois à des paramètres d'intensités (intensity), spatiaux (print area et manual print length) et temporels (duty cycle). Quel que soit le paramètre étudié, l'analyse de la marche a montré qu'ils reflètent la douleur postopératoire induite. En effet, la diminution de ces derniers après la chirurgie est provoquée par le fait que les animaux devenaient soit réticents, ou soit incapables de supporter une pression portante sur leur membre opéré. Ainsi, les rats traités avec le ciment contrôle présentent un niveau de douleur plus élevé à 24 heures postopératoires marqué par la diminution significative observée des paramètres testés par rapport aux valeurs de référence préopératoires. L'implantation de ciments chargés en anesthésique local a fourni une amélioration claire et continue de la démarche postopératoire, en particulier pendant la période postopératoire à court terme. En raison de la différence significative observée à 24 heures entre le Bupi-CPC, le Ropi-CPC et le CPC, les paramètres de surface de l'empreinte et d'intensité se sont révélés être des critères simples et fiables quant à l'évaluation de la capacité portante postopératoire et la récupération fonctionnelle du membre opéré. De plus, au cours de la période postopératoire à court terme, l'étude du duty cycle du membre postérieur implanté révèle une diminution de la durée de l'appui associée à une augmentation de la durée de l'oscillation. Les rongeurs étant des mammifères plantigrades, c'est-à-dire qu'ils se déplacent en prenant appui sur leur plante de pied,[261] la réduction de la longueur de l'empreinte est directement liée à la diminution de la surface de cette dernière. Ces deux paramètres (duty cycle et manual print length) n'ont montré aucune différence significative entre les deux CPC chargés, mais ils restent néanmoins significativement différents par rapport au ciment contrôle, soulignant ainsi la capacité analgésique de nos ciments combinés. Bien que le Bupi-CPC et le Ropi-CPC aient tous deux présenté des effets analgésiques semblables 24 heures et 48 heures après l'intervention, le Bupi-CPC semble offrir une rééducation fonctionnelle plus précoce et plus complète que le Ropi-CPC. Cette observation est en accord avec les propriétés pharmacocinétiques et de l'efficacité respective de ces deux principes actifs.[262]

En conclusion, sur les 29 paramètres relatifs au membre opéré (présentés dans les Tableau 15, 16 et 17), à 24 h postopératoires, 22 d'entre eux ont présenté des différences significatives entre les ciments chargés en anesthésiques locaux et le ciment contrôle. De plus, parmi ces paramètres, 5 ont montré des différences significatives entre le ciment chargé en bupivacaïne et le ciment chargé en ropivacaïne.

3.2.2. Influence sur le parallélisme

Dans cette étude, les modifications de la marche chez les rats opérés sont induites par une douleur chirurgicale et proviennent soit d'une réticence soit d'une incapacité à utiliser normalement le membre opéré. De ce fait, ces modifications peuvent engendrer des variations au niveau de l'allure du rongeur. Batka R. et al. a démontré qu'un des inconvénients majeurs des méthodes d'analyses de la démarche non forcée est l'incapacité à pouvoir contrôler la vitesse.[263] Ainsi, ce phénomène peut s'avérer problématique quant à l'utilisation des données dans un but quantitatif.

Trois paramètres ont été choisis pour l'étude de la variation de la vitesse : l'intensité maximale de l'appui (max contact intensity), la longueur de l'empreinte mesurée manuellement (manual print length), le temps de pose du membre (stand). Les diagrammes de dispersion (Figure 58), illustrent ces paramètres en fonction de la vitesse avant l'intervention chirurgicale. Nous avons choisi, ici, de distinguer les groupes d'animaux, même si les animaux n'ont pas encore subi d'opération afin d'observer l'homogénéité intergroupes. Il est remarqué ainsi que pour la gamme de vitesse de nos animaux (allant de 10 à 65 cm/s), seul le paramètre stand varie, ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus par Batka R. et al.[263]. Par ailleurs, il a été démontré que la totalité des paramètres temporels sont fortement liés à cette notion de vitesse.

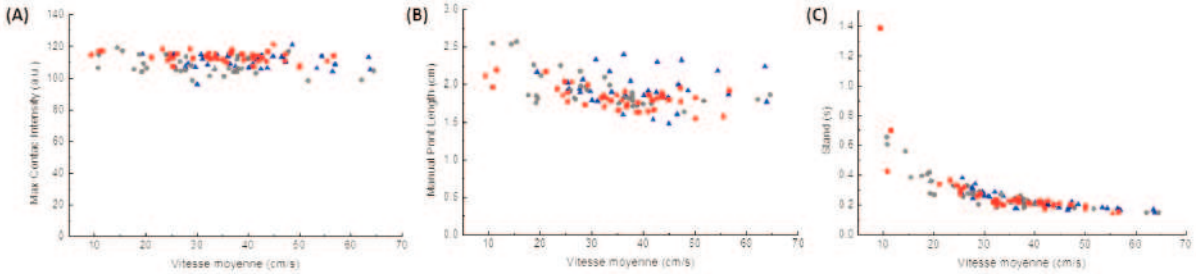


Figure 58 : Diagrammes de dispersion des variables (A) Max contact intensity (B) Manual print length et (C) Stand *d'une patte postérieure droite avant l'opération en fonction de* la vitesse avec le groupe du CPC (gris), celui du Bupi-CPC (bleu) et celui du Ropi-CPC (rouge)

Dans le but d'améliorer la pertinence de certains paramètres et de s'affranchir du phénomène de vitesse, les différents paramètres du membre opéré ont été évalués par rapport au membre controlatéral non opéré (noté RH/LH). La Figure 59 représente (A) la mesure de l'intensité en 2D des quatre pattes du rat et (B) l'intensité en 3D du membre opéré par rapport au membre non opéré. Ces deux représentations permettent clairement l'observation de la modification de l'intensité de l'empreinte du membre opéré par rapport aux autres membres. De plus, la

visualisation 3D permet d'observer des différences entre l'intensité des empreintes de la patte controlatérale notamment entre le CPC et le Ropi-CPC par rapport au Bupi-CPC. En effet, les empreintes du membre non opéré relatives au Bupi-CPC ont une intensité maximale supérieure aux empreintes provenant des deux autres CPCs. De ce fait, cette observation va engendrer des modifications sur l'allure globale des paramètres d'intensités.

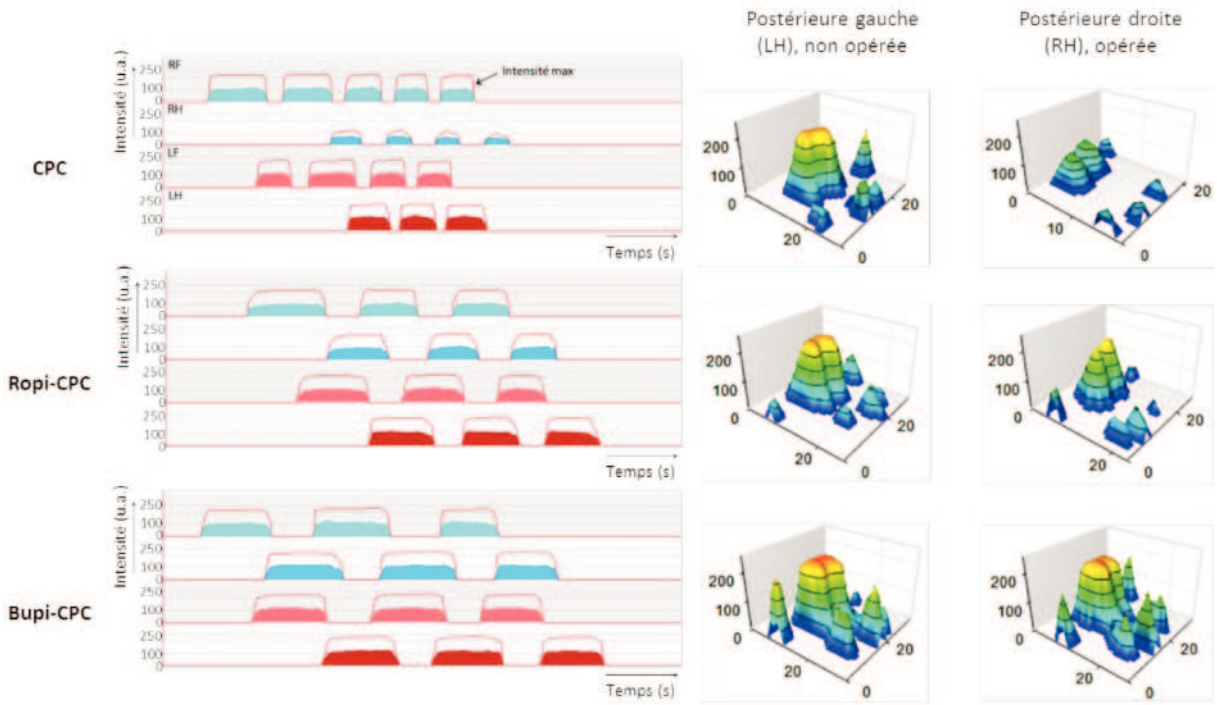


Figure 59 : (A) Intensité moyenne (■ ■ ■ ■) et maximale (—) à 24 h postopératoires pour chaque empreinte de patte et (B) intensités des empreintes des membres (opéré et non opéré) en 3D

Le paramètre max contact intensity du membre opéré est représenté sous la forme de radar (Figure 60), seul et par rapport au membre controlatéral non opéré. La max contact intensity du membre opéré des animaux implantés avec le CPC diminue jusqu'à atteindre un minimum à 24 h, soit une réduction de 23 ± 2 % par rapport à la ligne de base. Pour les rats traités avec les Ansth-CPCs, les max contact intensity relevées à 2, 24 et 168 h postopératoires montrent une différence significative entre ces deux CPCs, avec une récupération fonctionnelle plus rapide en faveur du Bupi-CPC. De plus, des différences significatives sont observées entre le CPC et les Ansth-CPCs ($p < 0,01$) à 6, 24 et 48 h postopératoires. Le retour à la ligne de base du paramètre max contact intensity pour le CPC est total à 7 jours postopératoires. Concernant ce même paramètre analysé sous la forme d'un parallélisme avec le membre controlatéral, des allures de courbes semblables sont observées que ce soit pour le CPC, le Bupi-CPC et le Ropi-CPC. Néanmoins, la différence entre le CPC et les ciments chargés en anesthésiques locaux est observée sur une plus longue plage de temps, c'est-à-dire que des différences sont

observées à 2, 4 et 48 h postopératoires ce qui n'était pas identifiable sur l'analyse de la patte seule. La symétrie confirme donc les résultats obtenus avec l'analyse de la patte opérée seule avec une meilleure sensibilité.

De la même manière, pour le paramètre manual print length (Figure 60), une meilleure significativité des résultats est obtenue avec notamment des différences entre le CPC et les ciments chargés à 2, 4 h et 48 h postopératoires. Celle-ci n'était pas discernable avec les résultats obtenus de ce même paramètre sur la patte opérée seule (page 114). Une différence significative entre les trois CPCs à 6 h postopératoires est également observée.

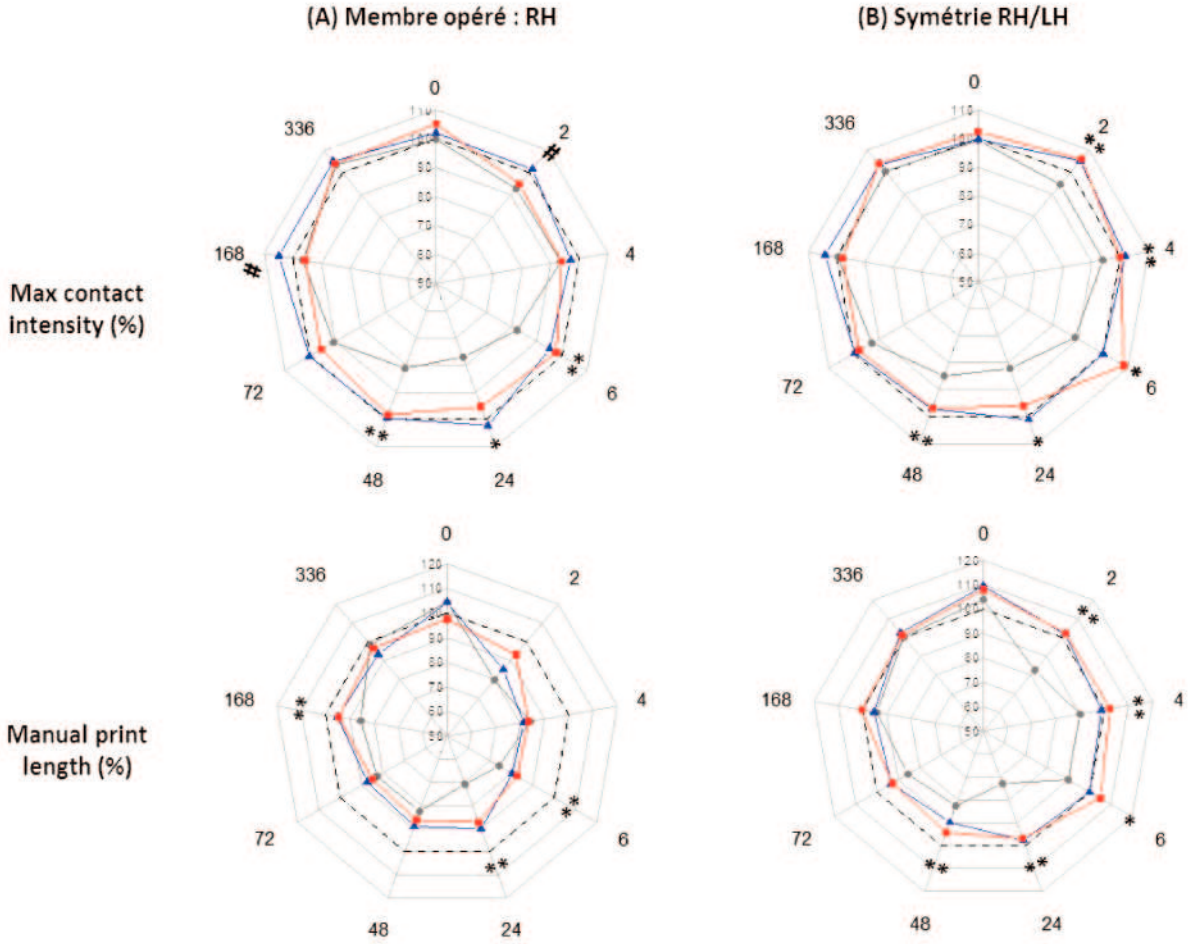


Figure 60 : Max Contact intensity et manual print lenght (A) du membre opéré et (B) du membre opéré par rapport au membre controlatéral. Graphique en % avec le (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres

Les résultats sur le paramètre stand sont totalement différents entre le membre opéré seul et l'analyse par symétrie (Figure 61). Ce paramètre sensible aux modifications de la vitesse ne permet pas d'obtenir des résultats quantifiables sur le membre opéré seul. La variation de vitesse pendant la période postopératoire étant similaire pour les trois groupes, il est donc

possible de considérer les résultats obtenus par l'analyse de la symétrie. Tout d'abord, il est observé une forte diminution du rapport RH/LH pour les animaux implantés avec le CPC, ce qui indique que les animaux ont tendance à moins poser leur patte opérée. Cette diminution est à son maximum à 24 h postopératoires avec une différence de 32 ± 2 % par rapport à la ligne de base. Cette observation est également valable pour les deux Ansth-CPCs avec un minimum de 86 ± 2 % décalé à 48 h postopératoires. De plus, des différences significatives sont observables entre le CPC et les ciments chargés en bupivacaïne et en ropivacaïne à 2, 4, 6, 24 et 48 h postopératoires. Pour finir, un retour à la ligne de base est observé pour les trois conditions à 14 jours. Cette méthode d'analyse permet ainsi d'obtenir des résultats fiables pour les paramètres sensibles à la vitesse. Dans la littérature, le stand est analysé sous forme de pourcentage par rapport au temps d'un cycle de la patte (stand + swing).[252,264] En effet, pour un animal contrôle, le stand d'une patte arrière représente environ 70 % du cycle de la patte et diminue de façon significative que ce soit pour une déficience neuropathique ou orthopédique.

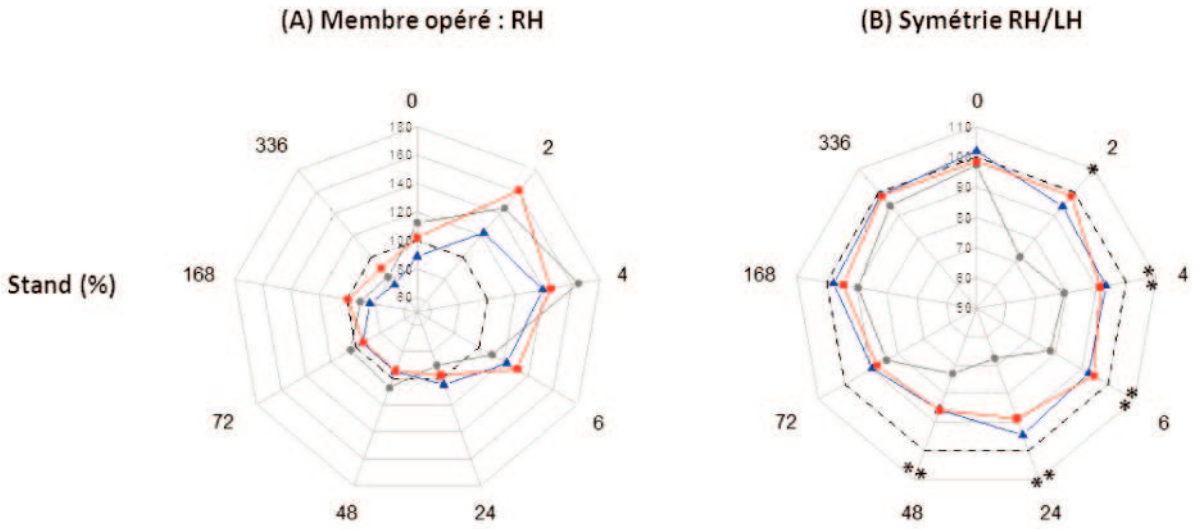


Figure 61 : Stand (A) du membre opéré et (B) du membre opéré par rapport au membre controlatéral. Graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noire), * p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres

Pour conclure, il est important de considérer, lors des modifications de la démarche, la vitesse à laquelle l'animal exécute le mouvement avec la patte lésée. Pour cela, l'étude du membre opéré par rapport au membre controlatéral s'avère être une méthode d'analyse adéquate et ce majoritairement pour les paramètres temporels (fortement liés à la vitesse). Néanmoins, il est important que la variation de vitesse à chaque temps d'analyse soit similaire pour tous les groupes d'animaux étudiés.

3.2.3. Influence sur la coordination

La coordination des animaux avant et après opération peut être suivie soit visuellement grâce à des diagrammes de coordination présentés Figure 62 soit grâce au paramètre de régularité (regularity index), Figure 63. Le diagramme de coordination montre l'ordre dans lequel les pattes sont placées sur la plaque de verre du Catwalk pendant l'essai. Ces dernières sont représentées par des points colorés et mettent en scène des motifs qui correspondent à l'alternance des quatre pattes.

Il existe différentes catégories permettant de classer ces motifs :

- Croisée,
  - CA avec la séquence de patte suivante : RF - LF - RH - LH,
  - CB avec la séquence de patte suivante : LF - RF - LH - RH,
- Alternée,
  - AA avec la séquence de patte suivante : RF - RH - LF - LH,
  - AB avec la séquence de patte suivante : LF - RH - RF - LH,
- Tournée.
  - RA avec la séquence de patte suivante : RF - LF - LH - RH,
  - RB avec la séquence de patte suivante : LF - RF - RH - LH.

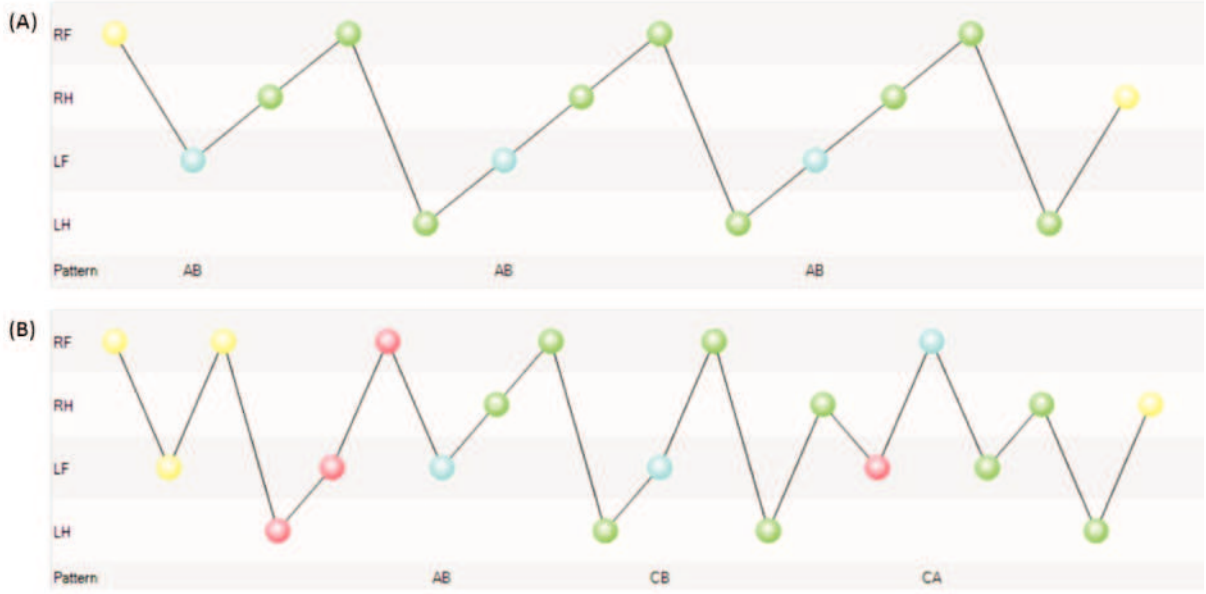


Figure 62 : *Diagramme de coordination des pattes. (A) Motif de pas d'un animal avant l'*opération et *(B) d'un animal implanté d'un CPC à 24 heures postopératoire. Les* points (i) bleus, correspond au *début du motif, (ii) verts, correspond aux pas qui font partis d'un motif, (iii) rouges, correspond aux pas qui ne font pas partis d'un motif et (iv) jaunes, correspond aux pas qui ne sont pas pris en compte.*

La Figure 62 représente les digrammes de coordination d'un animal avant l'opération et d'un animal implanté avec le CPC à 24 h postopératoires. Avant l'opération les motifs de pas débutent tous avec la patte avant gauche (LF : point bleu) et correspondent à des séquences de pas alternées AB. Cette dernière s'explique grâce à la stabilité qu'elle apporte lors de la démarche. En effet, lorsque l'animal est à l'arrêt, son corps est dans un état d'équilibre statique, c'est-à-dire, que le poids du corps s'oppose avec les forces engendrées par le sol sur les quatre membres. Ainsi, la stabilité du corps va dépendre de sa capacité portante face aux forces qui s'exercent sur lui. Dès lors, plus le centre de gravité du quadrupède est bas et plus la stabilité sur les quatre membres est grande. Lorsque la mise en mouvement a lieu, l'équilibre est modifié et va dépendre (i) de la durée des appuis (ii) de la force des appuis appliquée sur le sol et (iii) de la vitesse de déplacement. La marche d'un rongeur est qualifiée par une vitesse relativement lente dans laquelle le corps est soutenu par trois membres. Par conséquent, dans la recherche d'une stabilité optimale, la séquence de coordination choisie sera celle qui assure un appui des trois membres le plus large possible. Cette contrainte conduit les quadrupèdes, dans la majorité des cas, à favoriser la séquence alternée.[261]

Après l'implantation des biomatériaux, la stabilité du corps des animaux a été modifiée ce qui a par la suite engendré des perturbations sur la coordination des membres de ces derniers lors de la marche. Ainsi, une apparition des séquences croisées CA et CB a lieu pour la plupart des animaux implantés avec le CPC contrôle (Figure 62). Cette observation présentée sur la Figure 62 ci-dessus est confirmée grâce au paramètre de régularité présenté ci-dessous (Figure 63).

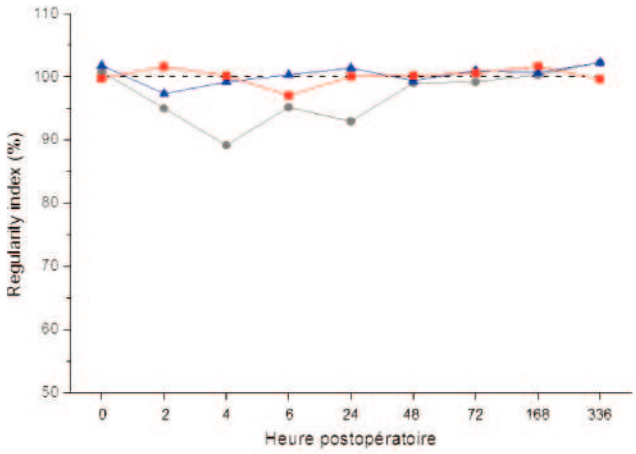


Figure 63 : Regularity index (A) graphique en % avec le CPC(gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir)

Avant l'intervention chirurgicale, la regularity index pour tous les rats est proche de 100 % et montre la stabilité du corps vis-à-vis de la marche. Après la chirurgie chez les animaux implantés avec le CPC, il est observé une légère dégradation de la regularity index jusqu'à un minimum de 89 % à 4 h postopératoires. À l'inverse, pour les animaux implantés de ciments chargés en anesthésiques locaux, ces derniers ne présentent pas de modification de la regularity index et ne sont pas différents de la référence (100 %). Il est donc possible d'en conclure que l'effet analgésique des ciments chargés (bupivacaïne ou ropivacaïne) permet aux animaux d'avoir une meilleure stabilité vis-à-vis de leur démarche postopératoire. Ces ciments offrent donc une réhabilitation fonctionnelle meilleure par rapport au CPC contrôle.

3.2.4. Avantages et limites du système Catwalk

Les études in vivo chez le modèle du rat ont été largement utilisées pour évaluer la capacité de reconstruction osseuse des substituts osseux PCa[265,266] et les douleurs de type aiguë et chronique.[267–269] En général, la méthode la plus couramment utilisée pour l'évaluation de l'allodynie mécanique chez les rats est le test Von Frey. Plusieurs articles traitent de la différence entre cette méthode et l'analyse de la démarche par le système CatWalk.[252,270] Ainsi, il semble que l'inconvénient majeur de la méthode Von Frey soit la difficulté d'établir un seuil correct. La force du filament est également influencée par l'hygrométrie ambiante et la température. De plus, les animaux sont testés dans des conditions restrictives très différentes des conditions proposées par le système Catwalk où les animaux ont la possibilité de se déplacer librement, ce qui minimise la préhension et réduit les facteurs de stress confusionnels. Par ailleurs, l'analyse qu'il fournit est objective et non invasive et permet l'étude d'un grand nombre de paramètres de la marche différents. Dans notre étude, l'analyse Catwalk nous a permis d'obtenir des résultats quantifiables jusqu'à 14 jours postopératoires alors que dans une étude précédente, l'utilisation de la méthode de Von Frey, a permis une analyse jusqu'à 3 jours postopératoires pour un même modèle chirurgical mais avec un biomatériau différent (céramique).[147]

Pour des raisons éthiques et médicales, le chlorhydrate de buprénorphine a été administré par voie sous-cutanée comme analgésie préventive, pendant la chirurgie. Cet analgésique ayant une durée d'action potentielle de 6 heures,[271] cela pourrait influencer les résultats obtenus au cours des premières étapes de l'évaluation Catwalk. Cependant, lors de nos études, toutes les interventions chirurgicales et les analyses de marche ont été effectuées dans les mêmes

conditions et à l'aveugle ce qui augmente ainsi la fiabilité et la comparativité des résultats obtenus.

Pour finir, la composante du stress de l'animal est un facteur non négligeable à prendre sérieusement en compte lors de la réalisation d'une étude de ce type. En effet, lors de la réalisation de l'étude CAAPRO 2, les animaux ont été soumis à de nombreux bruits provoqués par le déménagement entier des deux étages supérieurs. Il est alors possible que ces bruits aient engendré des troubles de stress sur notre population de rat. Afin de déterminer ce facteur, nous nous sommes basés sur une publication récente qui a démontré de nombreuses modifications de la démarche entre des animaux non stressés et des animaux stressés par le système Catwalk.[272] Afin de comparer la variation entre nos deux expérimentations CAAPRO 1 et 2, nous avons choisi d'utiliser 3 paramètres décrits dans la publication citée ci-dessus. Les paramètres utilisés sont les suivants (i) le temps de vol du membre opéré (swing) (ii) le temps d'un cycle de marche de la patte (step cycle) (iii) la vitesse moyenne de traversée (average speed).

Avant l'opération, il est observable que les différents paramètres sont significativement ($p < 0,01$ pour le step cycle et le swing et $p < 0,05$ pour la average speed) modifiés entre les deux expérimentations (Figure 64). Une fois implanté (avec le CPC) cette différence est également significative ($p < 0,01$ pour tous les paramètres) au temps où la douleur ressentie est la plus intense soit 24 h et 48 h postopératoires pour CAAPRO 1 et CAAPRO 2 respectivement. Ces résultats sont semblables à la publication,[272] c'est-à-dire qu'il y a une diminution des paramètres swing et step cycle entre CAAPRO 1 et CAPPRO 2 et une augmentation de la average speed entre CAAPRO 1 et CAAPRO 2, ce qui va dans le sens de notre hypothèse concernant le stress de nos animaux de CAAPRO 2. Il est également possible d'observer une forte différence de vitesse entre les deux expérimentations une fois le CPC implanté. Comme décrit dans la partie 2.2.2., le contrôle de la vitesse est l'inconvénient majeur des systèmes d'analyse de la marche non forcée et modifie jusqu'à 90 □ des paramètres du système Catwalk. Dans CAAPRO 2, la variation de vitesse est plus importante que dans CAAPRO 1 et ne varie pas de la même manière en fonction des groupes (sans doute dû au stress de certains animaux). Du fait de cette inhomogénéité de vitesse, aucun effet analgésique n'a pu être mis en évidence dans l'étude CAAPRO 2. Le stress de l'animal associé à des variations de vitesse importantes sont donc des limites considérables quant à l'analyse de la démarche postopératoire.

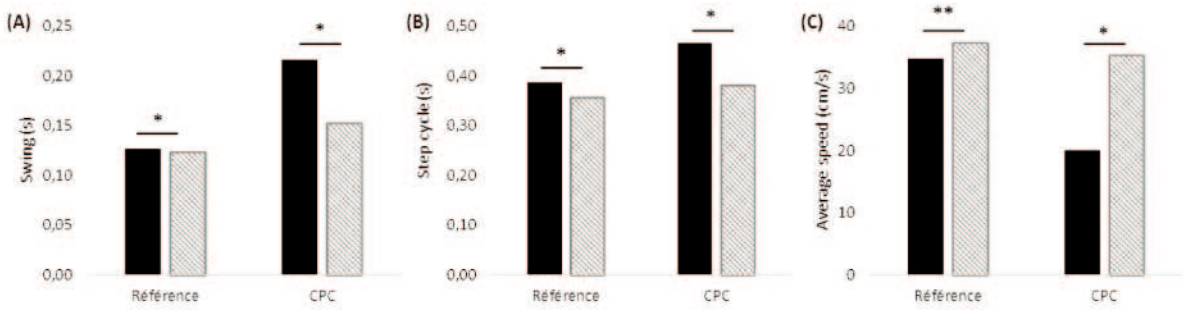


Figure 64 : Exemple de paramètres impactés par le stress (A) Swing (B) Step cycle et (C) Average speed avec CAAPRO 1 (noir), CAAPRO 2 (gris), **p < 0,05 et *p < 0,01

L'analyse de la marche CatWalk a été considérée, dans le cadre de notre étude, comme la meilleure méthode utilisable quant à l'étude de l'effet analgésique obtenu par l'implantation des CPCs chargés de deux médicaments analgésiques différents, la bupivacaïne et la ropivacaïne.[198] Elle a fourni une évaluation fonctionnelle du soulagement de la douleur généré par l'injection de CPCs chargés en anesthésiques locaux comparé à celle obtenue avec le ciment seul. Les données relatives à l'analyse de la démarche recueillies sont objectives et reproductibles pour un modèle animal qui mime la situation clinique.

4. Propriétés de reconstruction osseuse

4.1. Matériels et méthodes

4.1.1. Préparation d'échantillon : fixation, déshydratation, imprégnation et inclusion

Une fois les animaux sacrifiés, la partie distale des fémurs est explantée et placée immédiatement dans un milieu de fixation (formol neutre à 10 %) pendant 1 semaine. Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide de bains successifs d'éthanol. Le changement de bain est réalisé tous les 2 jours avec une augmentation graduelle de la concentration en éthanol (70, 80, 95, 100 %).

Les étapes de fixation et de déshydration une fois accomplies, les échantillons sont imprégnés par une solution de glycol méthyl méthacrylate (GMMA). Cette résine acrylique est obtenue en mélangeant 90 % de méthyl méthacrylate, 9 % de polyéthylène glycol et 1 % peroxyde de benzoyle à une température de 4 °C.

Les échantillons sont ensuite placés dans des moules et remplis par la résine. La polymérisation de cette dernière est amorcée par l'ajout d'un mélange de 99 % de NN-diméthylaniline et 1 % de propan-2-ol. Les moules sont ensuite refermés et placés dans une cloche à vide pendant 1h

dans le but de minimiser la présence d'oxygène dans l'échantillon. Pour finir, les échantillons sont stockés à 4 °C pendant 1 semaine.

Les blocs de résine résultant de l'inclusion sont taillés et polis afin d'obtenir la forme désirée pour pouvoir être placés dans le porte échantillon de la scie. Les échantillons sont alors sciés en 2 parties : une partie sera destinée à l'analyse par microscopie électronique à balayage et l'autre partie à l'histologie.

4.1.2. Microtomographie aux rayons X (µCT)

La microtomographie aux rayons X est une technique de microscopie non-invasive radiographique 3D. Cette technique non-destructive permet de retranscrire la géométrie et la structure interne d'un échantillon sous la forme d'images 3D. Les images 3D proviennent de l'acquisition d'une série de radiographies de l'échantillon pris selon différents angles de vue. Les radiographies obtenues sont des images 2D dont les niveaux de gris sont reliés à l'atténuation du faisceau de rayons X par les différentes composantes de l'objet. Ensuite, un algorithme mathématique va permettre la reconstruction de l'objet en 3D à partir de l'ensemble des radiographies. La visualisation 3D de l'échantillon est alors obtenue avec la possibilité de connaître les caractéristiques de sa structure interne.

Les échantillons fémoraux ont été analysés par microtomographie aux rayons X après l'étape de déshydratation. Chaque fémur a été placé séparément dans une paille remplie d'éthanol absolu afin d'éviter le dessèchement de l'échantillon lors de l'acquisition.

4.1.3. Microscopie électronique à balayage

Une fois le polissage miroir réalisé sur la surface du bloc de résine, celui-ci est métallisé par une fine couche d'or/palladium dans le but d'être observé au MEB. L'appareil utilisé est un Leo 1450 VP (Zeiss, Allemagne). Les images sont enregistrées en mode rétrodiffusé.

L'analyse de la microarchitecture est réalisée via le logiciel Leica QWin Pro. La zone biactive d'intérêt (Région D'Intérêt = RDI) est dessinée manuellement en forme d'anneau au niveau de l'interface entre la surface résorbée du CPC et le nouvel os formé. La RDI (Figure 65 A) comprend l'os néoformé qui est observé comme plus sombre par rapport à l'os mature qui l'entoure (Figure 65 B) et la partie réactive du ciment représenté comme plus claire sur les images MEB par rapport à la partie inactive (Figure 65 C).

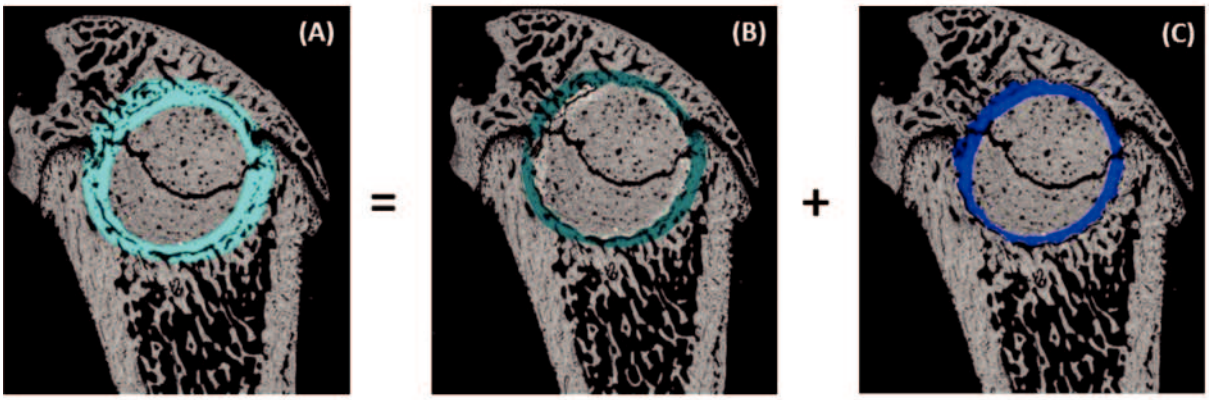


Figure 65 : Photographies MEB *de fémur après 3 semaines d'implantation. La région d'intérêt (RD*I) analysée à l'aide du logiciel Leica QWin Pro correspondait à (A) une zone bioactive (zone bleue plus claire) comprenant (B) l'os nouvellement formé (zone verte) et (C) la surface résorbée du ciment (zone bleue)

Le pourcentage de la surface du nouvel os formé par rapport à la totalité de la RDI et la zone de contact entre le nouvel os formé et l'implant ont été calculés après un seuillage manuel en niveaux de gris. Cette étape a pour but d'éliminer des pores du calcul de la surface. La partie inerte de l'implant a aussi été exclue du calcul afin d'augmenter la sensibilité. La zone de contact a été calculée comme la longueur cumulée où la zone du nouvel os formé et la zone de l'implant étaient en contact physique direct. Les valeurs sont finalement recalculées en µm² en sachant que la longueur d'un pixel est de 3,819 µm.
L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant le test Kruskal-Wallis.

4.1.4. Histologie et colorations

À partir des échantillons inclus, des coupes d'épaisseur de 4 à 7 µm ont été réalisées perpendiculairement à l'axe de forage de la zone d'implantation à l'aide d'un microtome de tissu dur (Polycut, Leica SM2500) équipé d'un couteau en carbure de tungstène.
Les colorations au pentachrome de MOVAT (Movat) et à l'hématoxyline-éosine (HE) ont été réalisées sur des coupes osseuses. Ces dernières ont été scannées et observées en utilisant le logiciel NDP.view2 (Hamamatsu) pour l'analyse histologique.

Hématoxyline Eosine (HE)

L'HE est la coloration topographique de référence. C'est une coloration cellulaire utilisée dans l'optique d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus. Elle permet de distinguer plusieurs types d'entités telles que les noyaux (bleu noir), le collagène (rose pâle), le cytoplasme et les fibres élastiques (rose), les fibres musculaires et les hématies (rouge vif).

Pentachrome de MOVAT

La coloration au pentachrome de MOVAT est une coloration tissulaire plus spécifique au tissu osseux. Elle permet de mettre en évidence : l'os minéralisé jeune (vert-jaune), l'os minéralisé vieilli (jaune-vert), le collagène et fibres réticulées (jaune), le tissu ostéoïde, le muscle et la fibrine (rouge), la moelle osseuse (rose pâle) et les composants non cellulaires (bleu ciel).

4.2. Résultats et discussions

4.2.1. Reconstruction 3D

La visualisation 3D permet d'observer la position des implants ainsi que leur structure au sein de l'os. Ces informations sont utiles dans l'exécution de la coupe de l'échantillon si ce dernier est mal positionné. De plus, les anomalies telles que la fuite du biomatériau sont également observables.

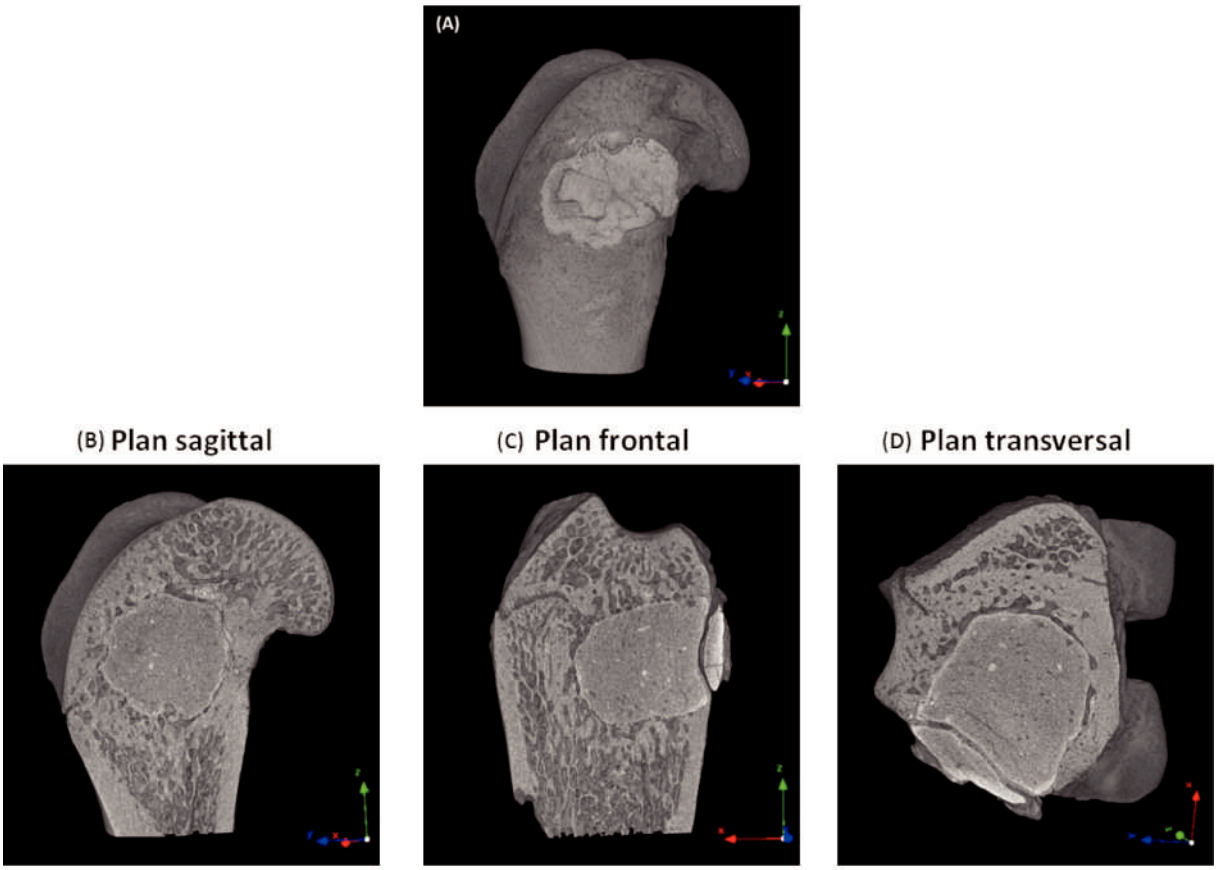


Figure 66 : Reconstruction 3D des *fémurs après 3 mois d'implantation chez le m*odèle du rat avec (A) le CPC contrôle et (B, C, D) les plans : sagittal, frontal et transversal du substitut

Le ciment est différenciable de l'os grâce à la légère différence d'opacité (Figure 66) ainsi que la différence de porosité. La visualisation 3D permet de localiser l'implantation du CPC. Il est

ainsi possible d'observer que les biomatériaux sont toujours présents 3 mois après l'implantation.

4.2.2. Observations MEB des implants

Trois semaines après l'implantation, les ciments injectés sont toujours présents dans tous les sites d'implantation et une nouvelle apposition osseuse est observée à la surface de chacun d'entre eux (Figure 67). Le pourcentage d'os nouvellement formé pour chaque condition de ciment est le suivant : 65 ± 5 %, 56 ± 4 % et 58 ± 1 % pour le CPC, le Bupi-CPC et le Ropi-CPC respectivement. Néanmoins aucune différence significative n'a été observée entre les trois formulations.

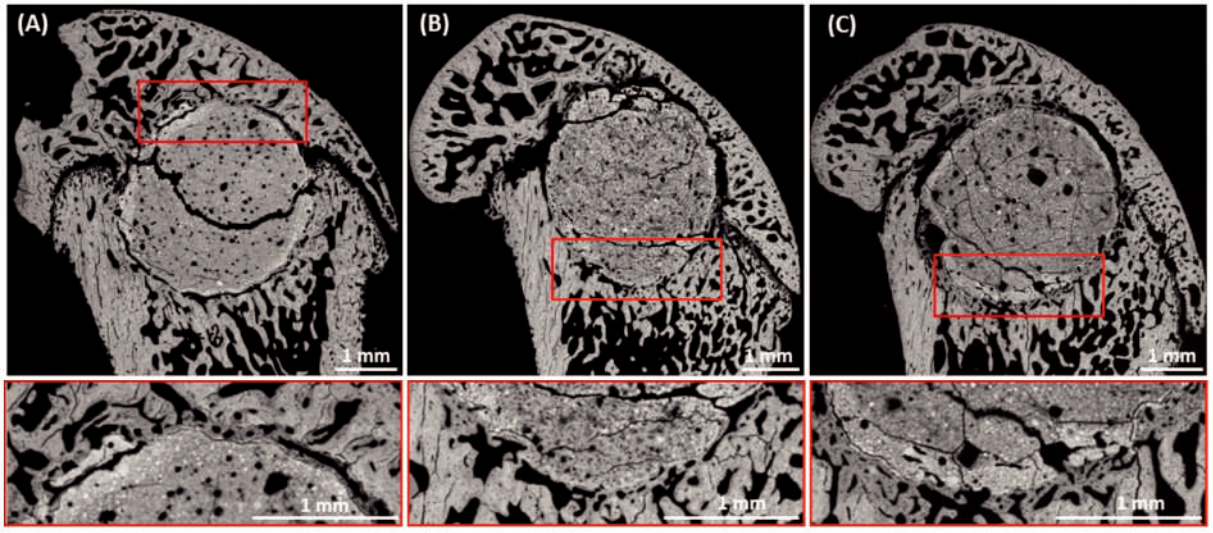


Figure 67 : Photographie MEB de la p*artie distale d'un fémur droit après 3 semaines d'implantation d'un substitut osseux chez le rat avec* (A) le CPC (B) le Bupi-CPC et (C) le Ropi-CPC

Concernant la seconde expérimentation, trois mois après l'implantation, il est observé (Figure 68) que tous les ciments injectés sont toujours présents et parfaitement ostéointégrés dans la matrice osseuse et ceci quelle que soit la formulation du ciment (chargé en analgésique ou non).

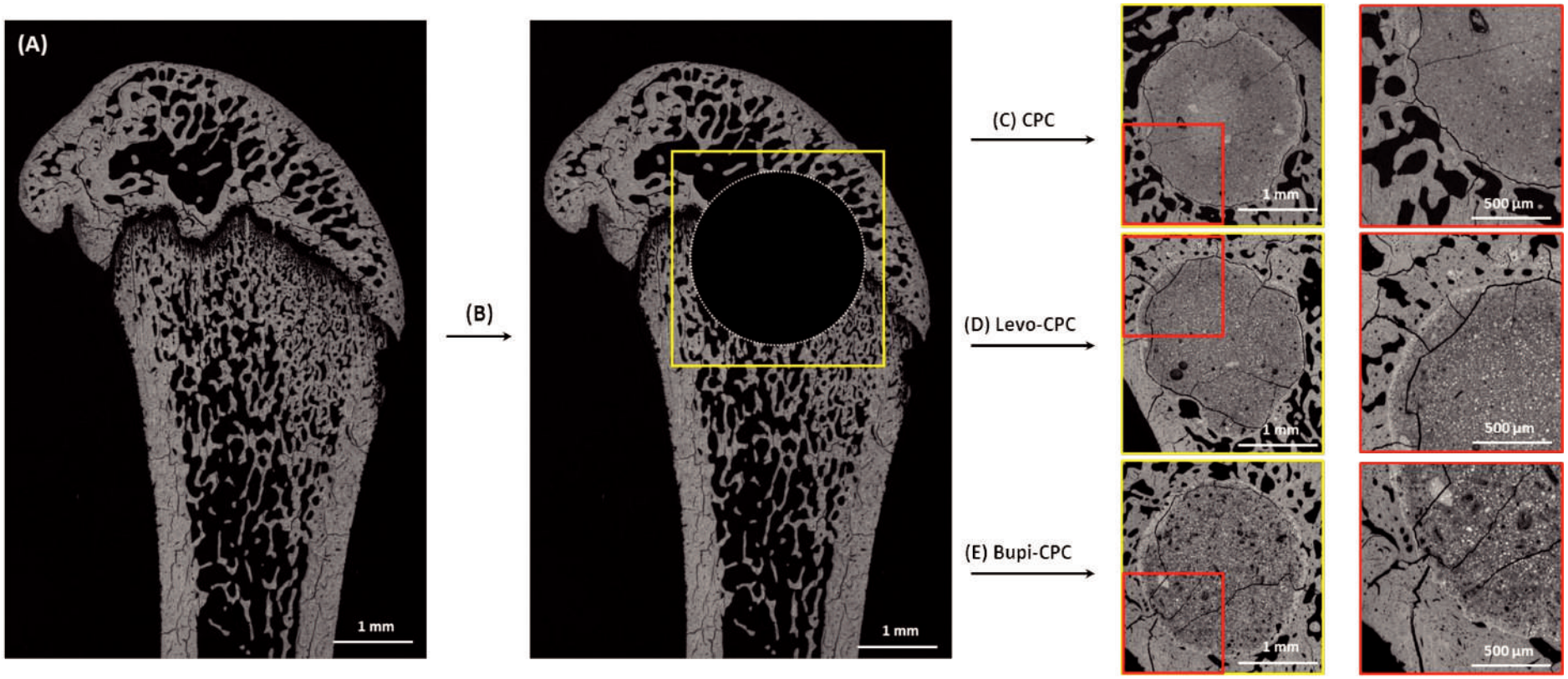


Figure 68 : *Photographie MEB de ciment après 3 mois d'implantation chez le rat. (A) Partie distale d'un fémur* droit non opéré (B) Création d'un défaut cylindrique de taille critique et (C, D, E) *clichés des ciments (contrôle et chargés) après 3 mois d'implantation*

4.2.3. Histologie

Conformément aux observations MEB, les biomatériaux visualisés en bleu sont toujours présents au sein de la partie distale du fémur 3 semaines après l'implantation. La libération locale des principes actifs n'a pas modifié les interfaces os-ciment et l'ostéointégration des deux CPCs chargés par rapport au CPC. Aucune réaction inflammatoire indésirable n'a été observée (Figure 69 A). Un tissu ostéoïde (flèche rouge) bordé par une lignée cellulaire d'ostéoblastes (flèche bleue) est observé pour tous les ciments après 3 semaines d'implantation (Figure 69 B). Pour finir, l'analyse histologique n'a révélé aucune hyperréactivité de la moelle osseuse (Figure 69 C).

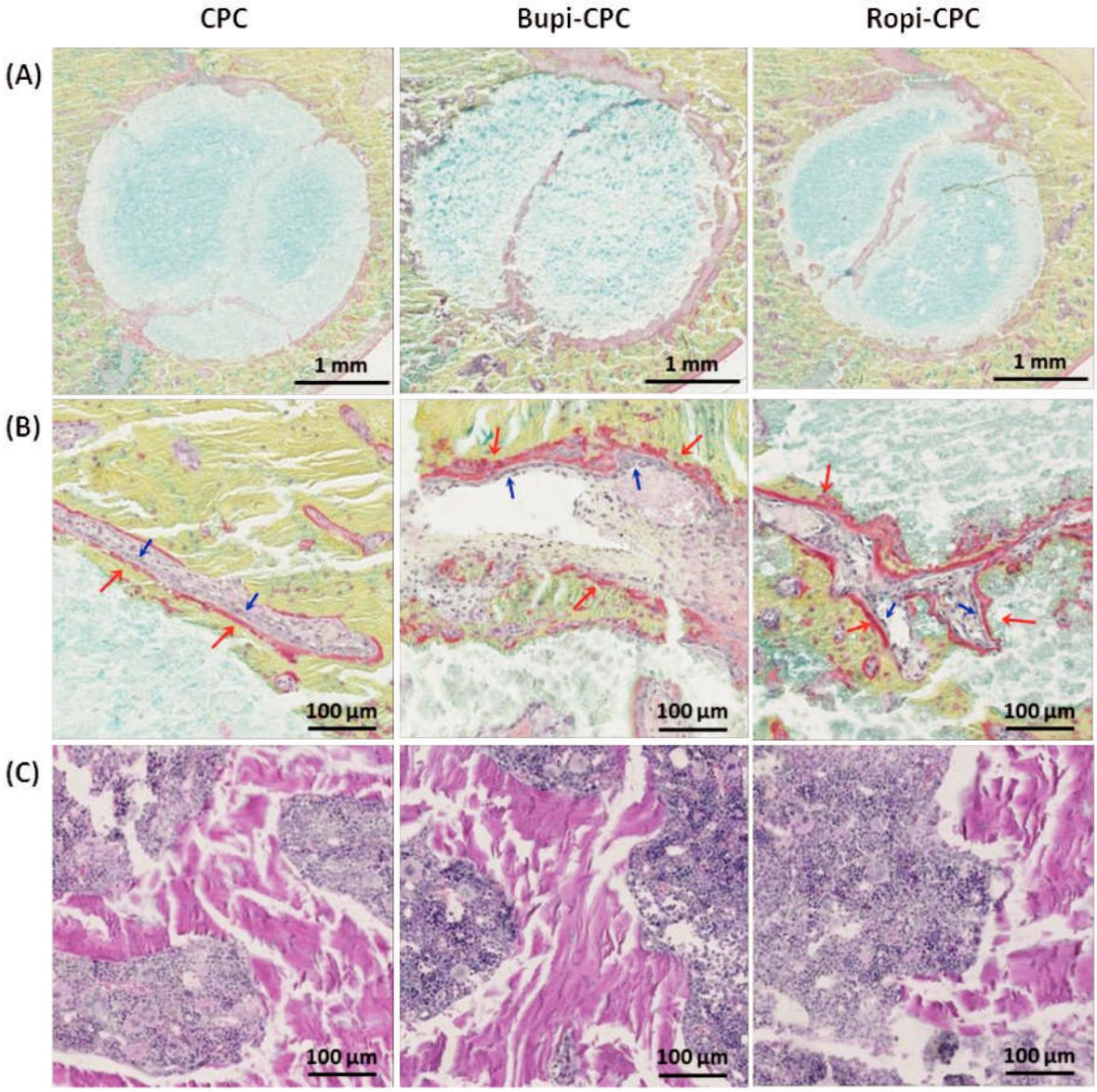


Figure 69 : Images histologiques des échantillons fémoraux après 3 semaines d'implantation. (A) À faible grossissement en coloration Movat avec le ciment (bleu), *l'os* (jaune-vert), le tissu mou (rose clair), (B) Détails de la nouvelle formation osseuse en coloration Movat avec le tissu ostéoïde (ligne rouge) et la lignée cellulaire ostéoblastique (ligne violette) et (C) Observation de la moelle osseuse en coloration HE

Des observations similaires ont été faites après 3 mois d'implantation des biomatériaux CPC, Bupi-CPC et Levo-CPC, c'est-à-dire qu'aucune inflammation entre l'implant et l'os n'a été détectée ainsi qu'aucune hyperréactivité de la moelle osseuse. Néanmoins, les substituts étant parfaitement intégrés dans la partie osseuse du fémur, aucun tissu ostéoide n'a été observé (Figure 70).

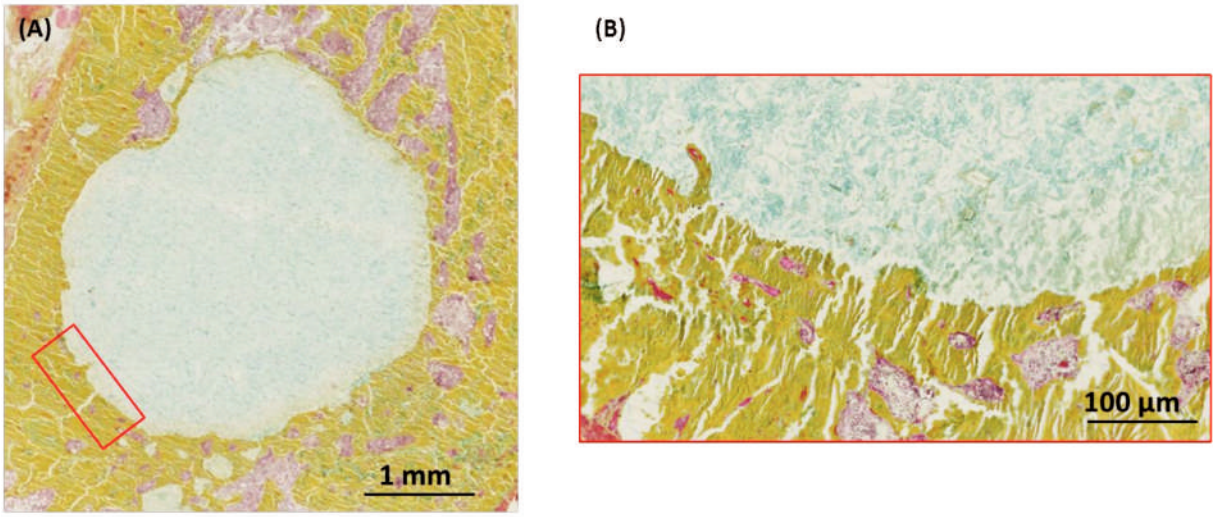


Figure 70 : Analyse histologique des échantillons fémoraux après 3 mois d'implantation. (A). À faible grossissement en coloration Movat avec le ciment (bleu), *l'os* (jaune-vert), le tissu mou (rose clair) et (B) détails *de l'interface CPC/os* en coloration Movat

Grâce aux analyses MEB et histologiques, nous avons pu démontrer que nos formulations de CPCs chargés en molécules analgésiques sont biocompatibles, bioactifs et ostéoconducteurs. Une période d'implantation plus longue aurait été nécessaire afin d'évaluer la biorésorbabilité de ces derniers.

5. Propriétés antibactériennes

De nos jours, les anesthésiques locaux font partie intégrante de la gestion de la douleur. Néanmoins depuis quelques décennies, des études ont permis de mettre en exergue les propriétés antimicrobiennes de ces molécules contre un large spectre de micro-organismes.[195–197] En général, les bactéries les plus fréquemment impliquées dans les infections après une chirurgie osseuse[273] sont le staphylocoque doré (S. aureus) et le staphylocoque blanc (S. epidermidis). Il a été démontré notamment que la bupivacaïne inhibait la prolifération de ces bactéries (10^6 bactéries/mL) à partir de 2,5 mg/mL[196,274] alors que la levobupivacaïne et la ropivacaïne n'étaient actives qu'à partir de 5 mg/mL.[195,275] La bupivacaïne a également montré une activité bactéricide[197] sur une souche S. aureus (10^6 bactéries/mL) pour des concentrations

supérieures à 5 mg/mL néanmoins les auteurs n'ont pas pu déterminer cette valeur avec précision à cause de la solubilité de cette molécule.

Ainsi, cette partie vise à étudier l'activité antibactérienne des ciments combinés en anesthésiques locaux vis-à-vis de la flore bactérienne observable lors d'une chirurgie osseuse. Pour des raisons de coût, seul le Bupi-CPC sera étudié dans cette analyse préliminaire.

5.1. Protocole expérimental

L'activité antibactérienne du Bupi-CPC a été évaluée grâce à l'utilisation de souche de référence ATCC (American Type Culture Collection) soit la souche ATCC® 29213™ pour le S. aureus et la souche ATCC® 12128™ pour le S. epidermidis.

5.1.1. Concentration minimale inihbitrice et bactéricide

Tout d'abord, l'activité antimicrobienne de la bupivacaïne incorporée a été mesurée en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB). La CMI est définie comme étant la plus faible concentration permettant d'empêcher le développement total des bactéries et la CMB comme la plus faible concentration permettant de tuer plus de 99 % d'une population bactérienne. Pour ce faire, une gamme de dilution a été réalisée à partir d'une solution mère de bupivacaïne à 28 $mg.mL^{-1}$ dans un bouillon de Mueller-Hinton (MH). Ce dernier est composé d'extrait de viande, d'hydrolysat acide de caséine et d'amidon soluble pour un pH du milieu à 25 °C de 7,3 ± 0,2.[276] Ensuite, un inoculum bactérien pour chaque souche a été préparé à partir de cultures de staphylocoques dorés et blancs. La concentration a été ajustée à 10^8 $bactéries.mL^{-1}$ à l'aide d'un densitomètre (DENSIMAT, bioMérieux). Les plaques multipuits contenant les différentes solutions ont été par la suite ensemencées de façon à obtenir des concentrations en bactéries allant de 10^2 à 10^6 $bactéries.mL^{-1}$ dans chaque tube, puis ces derniers ont été placés dans une étuve à 37 °C pour une période d'incubation de 24 h en aérobiose. Les CMI sont déterminées lorsqu'aucun trouble n'est visible dans le bouillon de culture. Un témoin positif, ne contenant pas de bupivacaïne a été utilisé afin de contrôler la croissance bactérienne. À la suite de ces résultats, les cultures ont été repiquées sur gélose columbia + 5 % sang de cheval (COH, bioMérieux) et incubées à 37 °C pendant 24 h en aérobiose. Les CMB ont été définies lorsqu'aucune croissance microbienne n'est observée. Tous les essais ont été réalisés en duplicata pour chaque concentration de bupivacaïne.

5.1.2. Essai sur la libération de la bupivacaïne

La libération a été effectuée à partir de pastilles de Bupi-CPC, préparées selon le protocole décrit page 72. Une fois sèches, ces dernières ont été immergées dans un 1 mL d'une solution de NaCl à 0,9 %, puis placées dans une étuve à 37 °C installée sur un agitateur orbitalaire (90 tr/min). Aucun renouvellement de la solution n'est effectué afin d'obtenir une concentration adéquate en bupivacaïne. Cette concentration a été par ailleurs quantifiée par spectroscopie UV-visible.

Les expériences avec les souches S. aureus et S. epidermidis ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment.

5.2. Résultats et discussions

5.2.1. Détermination des CMI et CMB

Les CMI et CMB déterminées pour les différentes souches sont présentées dans les tableaux 20 et 21 ci-après. La bupivacaïne présente une activité inhibitrice et bactéricide à partir de 2,5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^2 bactéries.mL^{-1}, puis à partir de 5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 bactéries.mL^{-1} sur la souche S. aureus.

Tableau 20 : Résultats des CMI et des CMB de la bupivacaïne en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. aureus

Bactéries	**CMI (mg.mL^{-1})**	**CMB (mg.mL^{-1})**
10^2	2,5	2,5
10^3	5	5
10^4	5	5
10^5	5	5
10^6	5	5

Concernant la souche S. epidermidis, la bupivacaïne présente une activité inhibitrice à partir de 2,5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^2, 10^3, 10^4 et 10^5 bactéries.mL^{-1}, puis à partir de 5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^6 bactéries.mL^{-1}. L'activité bactéricide est détectée à une concentration de 2,5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^2 bactéries.mL^{-1}, puis à partir de 5 mg.mL^{-1} pour une quantité de 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 bactéries.mL^{-1}.

Tableau 21 : Résultats des CMI et des CMB de la bupivacaïne en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. epidermidis

Bactéries	**CMI ($mg.mL^{-1}$)**	**CMB ($mg.mL^{-1}$)**
10^2	2,5	2,5
10^3	2,5	5
10^4	2,5	5
10^5	2,5	5
10^6	5	5

5.2.2. Étude des activités inhibitrice et bactéricide d'un Bupi-CPC

Après 2 semaines de libération, les pastilles du Bupi-CPC ont libéré une concentration de 10 mg/mL en bupivacaïne. Cette libération a montré une activité à la fois inhibitrice et bactéricide pour la totalité des solutions soit pour une quantité allant de 10^2 à 10^6 bactéries.mL^{-1}. La bupivacaïne intégrée dans le biomatériau est donc toujours active après avoir été libérée. Ce résultat est cohérent avec les CMI et CMB effectuées ainsi qu'avec la littérature.[196,197]

En conclusion, la bupivacaïne est un anesthésique local qui possède des propriétés inhibitrices et bactéricides sur les souches S. aureus et S. epidermidis. Dès lors que ce principe actif est inclus dans un ciment phosphocalcique, la bupivacaïne ne perd pas ses propriétés antibactériennes. Ainsi, ce système combiné a également la capacité de prévenir des potentielles infections lors d'une chirurgie mini-invasive. En un mot, pour une quantité intégrable de bupivacaïne dans un ciment phosphocalcique, ce principe actif assure à la fois un rôle analgésique et anti-infectieux.

6. Conclusions et perspectives

À notre connaissance, c'est la première fois que le système CatWalk est utilisé pour évaluer le soulagement de la douleur fourni par l'implantation de substituts osseux chargés de médicaments analgésiques. Ce type d'analyse est une méthode appropriée pour étudier la récupération fonctionnelle après une procédure d'autogreffe osseuse suivie par le remplissage du défaut osseux créé avec un biomatériau chargé d'analgésique. La méthode démontre des différences significatives au niveau des effets analgésiques induits par les ciments phosphocalciques chargés en principe actif comparé au ciment phosphocalcique contrôle. De plus, ces études in vivo préliminaires montrent que ces formulations de ciments injectables sont bien tolérées et prodiguent la libération contrôlée d'un anesthésique local durant plusieurs jours et jusqu'à 2 semaines. Pour finir, les études in vitro présentent des activités inhibitrice et bactéricide du ciment chargé en bupivacaïne sur la flore présente lors de chirurgie osseuse (S. aureus et S. epidermidis). Ainsi, ces nouveaux ciments présentent les propriétés requises pour une utilisation dans des études précliniques et dans un protocole global de gestion de la douleur après une chirurgie osseuse.

CHAPITRE III : CIMENT APATITIQUE GALLIÉ A VISÉE THÉRAPEUTIQUE

Le tissu osseux est un tissu dynamique dont l'activité évolue tout au long de la vie. Ce changement peut être caractérisé selon trois phases représentées sur la Figure 71 : (i) une phase de croissance osseuse où la masse osseuse augmente rapidement jusqu'à atteindre un pic (de la naissance à 18-20 ans) (ii) une phase où la masse osseuse reste stable (pendant une dizaine d'années) et (iii) une phase de perte osseuse. Cette dernière phase s'avère différente en fonction du sexe de l'individu. Chez l'homme, la décroissance est linéaire et lente (0,5 % par an), alors que chez la femme cette diminution est fractionnée avec une accélération du phénomène à la ménopause (3 - 5 % par an pendant 2 à 3 ans) puis 1 - 2 % par an pendant les 5 à 10 années suivantes pour finalement se stabiliser autour de 0,5 - 1 % par an. Cette perte importante du tissu osseux provient d'un déséquilibre de la balance osseuse lié au déficit du taux d'œstrogènes entraînant ainsi une activité accrue des ostéoclastes.

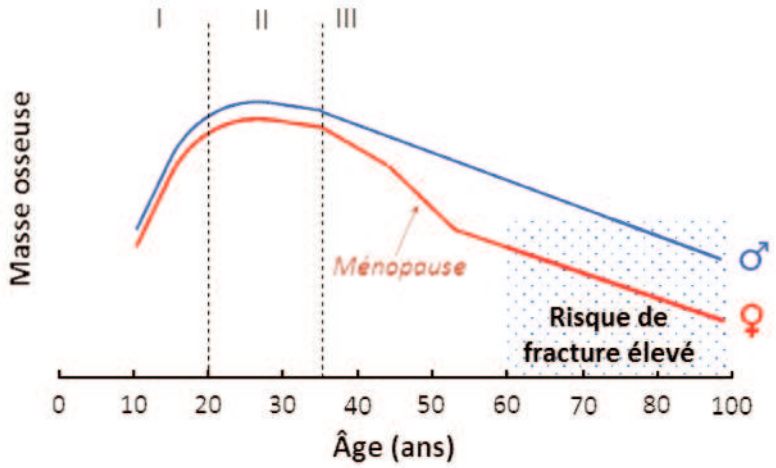


Figure 71 : Évolution de la masse osseuse au cours de la vie avec la représentation des phases I, II et III. Figure adaptée [63]

Cependant, hormis le phénomène physiologique, il existe d'autres causes à l'origine d'un déséquilibre du remodelage osseux responsable d'une perte de substance osseuse. C'est le cas des affections telles que l'ostéoporose et les cancers osseux qui seront décrits succinctement dans la partie suivante.

1. Pathologies osseuses

1.1. Ostéoporose

De nos jours, l'ostéoporose et les fractures qui lui sont associées sont un problème de santé publique majeur, en raison de l'allongement de l'espérance de vie dans les pays développés. Il est estimé qu'environ 39 % des femmes de 65 ans souffrent d'ostéoporose ainsi que 70 % des femmes âgées de 80 ans et plus.

L'ostéoporose est une pathologie caractérisée par un remodelage osseux anormal et excessif, aboutissant à la diminution de la masse osseuse ainsi qu'à la détérioration de la microarchitecture osseuse (Figure 72). En 1994, un groupe d'expert de l'OMS a développé une méthode, permettant de caractériser cette pathologie, basée sur la densité minérale osseuse (DMO).[277] Celle-ci est exprimée sous la forme d'un « T-score » c'est-à-dire, qu'elle est représentée par « l'écart entre la densité osseuse mesurée et la densité osseuse théorique de l'adulte jeune (20 à 25 ans) de même sexe, sur le même site osseux, exprimé en écart-type ».[278] Par conséquent, un patient ayant un T-score supérieur à -1 possède une densité normale, celui ayant un T-score entre -1 et -2,5 souffre d'ostéopénie alors que celui dont le T-score est inférieur à -2,5 est classé comme ostéoporotique. Dans le cas où ce dernier T-score est associé à d'une ou plusieurs fractures, on parle d'une ostéoporose sévère.

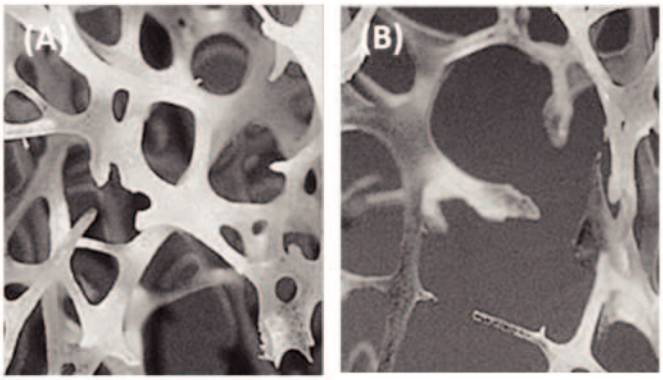


Figure 72 *: Structure d'un os spongieux normal (*A*) et d'un os s*pongieux ostéoporotique (B)[279]

Les fractures les plus fréquentes sont les fractures vertébrales (ou tassements vertébraux), celles de la hanche (ou du col du fémur) et celles du poignet. Pour les personnes âgées, les fractures du col du fémur s'avèrent avoir d'importantes conséquences puisque l'intervention chirurgicale est lourde et engendre une convalescence de longue durée associée à une perte d'autonomie. De plus, ces patients présentent un risque de mortalité élevé durant l'année suivant la fracture.[280] Il existe un outil (FRAX), permettant l'évaluation des risques de développement d'une fracture. Selon le niveau de risque, un traitement sera instauré ou réajusté.[281]

Par conséquent, le diagnostic repose sur la détermination de la DMO mais aussi de l'évaluation du risque de fracture. Les médecins pourront alors discuter de la nécessité d'instaurer un traitement. Les principaux traitements anti-ostéoporotiques existants sur le marché sont : les bisphosphonates, les Modulateurs Sélectifs des Récepteurs des Estrogènes (SERM), le ranelate de strontium, les parathormones et les anticorps monoclonaux.[282]

1.2. Tumeurs osseuses

Le tissu osseux est un environnement propice au développement de tumeurs (bénignes ou malignes). Il existe deux types de tumeurs (i) les tumeurs primitives et (ii) les tumeurs secondaires appelées aussi métastases osseuses.

Les différents types de tumeurs osseuses ainsi que leurs fréquences varient essentiellement en fonction de l'âge. Trois groupes sont répertoriés (i) entre 5 et 20 ans (ii) entre 20 et 50 ans et (iii) plus de 50 ans. Les tumeurs primitives sont rares et touchent essentiellement l'enfant, l'adolescent et le jeune adulte. Pour les enfants de moins de 5 ans, elles sont par exemple un lymphome, une métastase d'un neuroblastome, un sarcome d'Ewing et pour ceux âgés de plus de 5 ans, elles sont généralement un ostéosarcome (Figure 73) ou un sarcome d'Ewing. En revanche, les métastases osseuses concernent majoritairement les adultes. Celles-ci, signent la généralisation d'une pathologie cancéreuse, comme chez 65 à 80 % des patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate.[283] Le squelette après les ganglions, le poumon et le foie est le 4ème site métastatique.[284] Les tumeurs osseuses malignes sont associées à un mauvais pronostic fonctionnel en dépit des progrès au niveau de la prise en charge médico-chirurgicale. De plus, les métastases peuvent engendrer des complications telles que les fractures, l'hypercalcémie ou encore une compression de la moelle épinière.[285]

Figure 73 : Ostéolyse engendrée par des métastases osseuses provenant de différents types de cancers (sein, poumon et rein) [284]

La majorité des lésions tumorales sont de nature ostéolytique. La résorption osseuse induite par les cellules cancéreuses provient de mécanismes complexes faisant intervenir notamment des modulateurs du remodelage osseux comme le ligand RANK (noté RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG). Ces derniers travaillent de concert dans le but de réguler l'activité ostéoclastique. Le RANKL par l'intermédiaire des récepteurs RANK permet d'activer la maturation des ostéoclastes. Le maintien de l'équilibre entre la formation et la résorption de l'os est ensuite modulé naturellement par l'OPG, qui permet en se fixant sur les récepteurs du RANKL d'empêcher ce dernier de se fixer et ainsi d'inhiber la formation d'ostéoclastes. Dans un site osseux métastasique, le RANKL est engagé dans un « cycle vicieux » d'ostéolyse et de croissance tumorale. En effet, certaines tumeurs ont la capacité de produire des facteurs de croissance permettant d'augmenter la libération du RANKL, stimulant l'activité ostéoclastique et engendrant par conséquent une perte osseuse excessive. Cette résorption engendre, par le biais de la libération importante du calcium et de facteurs de croissance, une hypercalcémie ainsi qu'une stimulation de la cellule tumorale contribuant davantage au cycle d'ostéolyse.[284]

Ainsi, ces tumeurs osseuses secondaires induisent des complications dévastatrices et extrêmement douloureuses. Depuis quelques années, les traitements ont pour défi de vouloir bloquer le processus métastasique ainsi que l'expansion tumorale de la matrice osseuse. Néanmoins, en dépit des progrès acquis dans ces médications et approches chirurgicales, les traitements restent le plus souvent palliatifs dont l'objectif consiste en l'amélioration de la qualité de vie du patient.[286]

2. Propriétés biologiques et applications thérapeutiques du gallium

Lors de ces dernières années, de nombreux composés à base de gallium ayant un potentiel thérapeutique ont vu le jour. De par sa similarité avec l'ion Fe^{3+}, le gallium a la capacité d'interférer avec l'homéostasie du fer. En effet, grâce à l'utilisation du ^{67}Ga, il a été démontré la présence de cet élément au sein du plasma intimement lié à la protéine de transport du fer, la transferrine.[287,288] Avec une affinité supérieure, cette compétition de fixation génère une diminution des stocks intracellulaires en fer au sein des cellules malignes et des micro-organismes comportant des récepteurs à la transferrine. En conséquence, les processus cellulaires dépendants du fer tels que la viabilité et la croissance sont sévèrement impactées et peuvent conduire à l'apoptose des cellules.[289,290] Cette interaction entre le gallium et la

transferrine pourrait être exploitée pour des applications thérapeutiques dans le domaine biomédical comme traitement pour certains cancers ou infections.

Notre étude visant à l'utilisation du maltolate de gallium, les études et les résultats obtenus dans la littérature sur ce complexe seront mis en avant dans le déroulé de cette thèse.

2.1. Structures chimiques

Le potentiel thérapeutique du gallium a été mis en évidence en 1931 par Levaditi et al. grâce à l'utilisation du tartrate de gallium qui a permis d'éradiquer la syphilis chez le lapin et le Trypanosoma evansi chez la souris.[291] Néanmoins une évaluation plus poussée du potentiel du gallium comme la distribution tissulaire, la toxicité ou l'activité biologique semble être restée en suspens jusqu'aux années 50. Dès lors, le nitrate de gallium a été testé comme agent expérimental (NSC 15200) après la mise en évidence de son activité antitumorale chez les rongeurs.[292] Depuis, des composés galliés, allant du simple sel de gallium (comme le nitrate de gallium) aux structures plus ardues (comme les complexes de gallium), ont été développés (Figure 74).

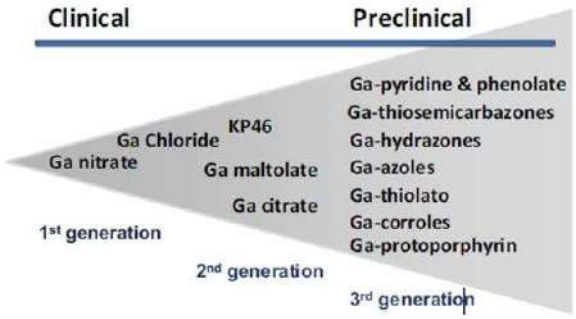


Figure 74 : Différents composés thérapeutiques à base de gallium [293]

La première génération de composés est représentée par le nitrate de gallium puisqu'il fut le premier médicament à passer en phase clinique aux États-Unis.[292] Par la suite, le chlorure de gallium a démontré une activité thérapeutique chez les patients atteints de cancer du poumon après une administration par voie orale.[294,295] La deuxième génération est caractérisée par la synthèse de deux complexes tels que le tris (8-quinolinolato) gallium (KP46) et le maltolate de gallium (GaM).[296] Par rapport à la première génération, ces deux molécules ont une bonne biodisponibilité du gallium par voie orale chez l'Homme. Pour finir, la troisième génération, dont les PA sont en étude préclinique, comprend des complexes synthétisés à partir des ligands organiques tels que la pyridine et le phénolate.[297,298]

Ces différents composés de 1ère, 2ème ou 3ème génération ont montré diverses activités thérapeutiques sur les cancers, les infections et les inflammations.

2.2. Applications thérapeutiques

2.2.1. Le gallium pour l'imagerie médicale

Le gallium possède plusieurs radio-isotopes, dont les plus importants commercialement sont le gallium-67 et le gallium-68, qui permettent le suivi d'une pathologie par imagerie. Le ^{67}Ga, dont la demi-vie est de 3,3 jours, est produit à partir d'un cyclotron sous la forme d'un citrate de ^{67}Ga. Grâce à la capacité du gallium à se localiser dans les tumeurs et les sites d'inflammation,[299,300] la scintigraphie au ^{67}Ga a pu être développée afin de déceler l'apparition des cancers chez l'Homme.[301] Cette technique repose sur l'administration dans l'organisme d'un radioélément qui, lors de sa désintégration, va émettre un rayonnement gamma qui sera par la suite détecté par une gamma-caméra. De nos jours, la scintigraphie au ^{67}Ga a été largement remplacée par la Tomographie par Émission de Positons (PET), une technique basée sur l'administration d'un radio-pharmaceutique, dans l'organisme, dont la désintégration de l'élément engendre une émission d'un positon. Celui-ci, à la rencontre d'un électron, va s'annihiler et produire, en concomitance, deux photons γ antiparallèles à 511 keV. Ces derniers sont détectés en coïncidence à l'aide d'une gamma-caméra. Cette technique permet d'obtenir une reconstruction 3D des organes à surveiller et utilise généralement des radioéléments dont la durée de demi-vie est relativement courte, comme le ^{68}Ga (67,71 min). Ainsi, des nouveaux produits pharmaceutiques marqués au ^{68}Ga sont apparus. De plus, le ^{68}Ga est produit à partir d'un générateur de germanium-68, permettant ainsi une élaboration plus simple avec un minimum d'infrastructure, comparé au ^{67}Ga. Par conséquent, cet outil s'avère dès lors indispensable pour l'imagerie tumorale aidant au diagnostic, au suivi du traitement ainsi qu'à la surveillance d'une éventuelle récidive.

Il existe d'autres techniques d'imageries telles que l'imagerie PIXE (Particle Induced X-ray Emission Spectrometry) qui fut utilisée pour imager le gallium à l'intérieur de cellule cancéreuse in vitro[302] ou la microtomographie X. Cette dernière permet au chirurgien de contrôler avec précision l'injection du ciment osseux dans la zone pathologique grâce à la radio-opacité du biomatériau. Des essais préliminaires non publiés ont déjà été réalisés sur du β-TCP gallié (Figure 75). Cette association du gallium au phosphate de calcium entraîne alors l'augmentation de la radio-opacité de ce dernier.

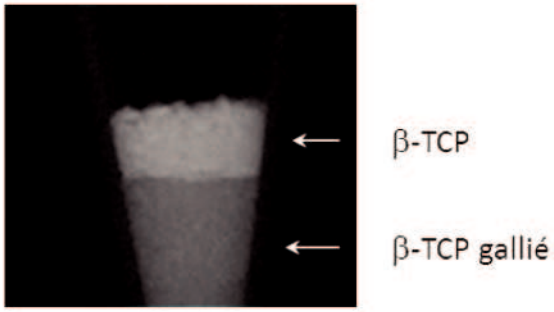


Figure 75 : Modification de la radio-opacité du *β-TCP par l'incorporation de gallium*. Photographie non publiée P. Janvier

2.2.2. Activités anti-inflammatoires et immunosuppressives

Il est reporté dans la littérature de nombreuses études précliniques montrant l'impact des composés galliés sur le système immunitaire ainsi que sur les processus inflammatoires. Par exemple, l'exposition de poissons pendant 96 h à des concentrations sublétales de nitrate de gallium a déclenché la diminution de certains paramètres du système immunitaire comme la production d'immunoglobulines.[303] Le GaM, d'après une étude visant à inhiber l'activation et la prolifération des lymphomes T, a démontré son efficacité par l'intermédiaire d'une modification des concentrations de cytokines. De ce fait, l'impact de ce PA sur ces dernières peut être pertinent sur l'étude des lymphomes cutanés puisque ceux-ci peuvent provenir d'un contexte d'inflammation chronique.[304]

2.2.2. Activités antimicrobiennes

En 1931, Levadati a décrit pour la première fois, le potentiel antimicrobien du gallium en éradiquant la syphilis chez le lapin. Mais ce n'est que récemment que l'étude de cette propriété a été relancée.[305] Il a été démontré que le gallium sous sa forme ionique peut entrer en compétition avec le fer au niveau de la fixation aux sidérophores (des chélateurs de fer synthétisés et sécrétés par les micro-organismes leurs permettant ainsi de puiser le fer nécessaire à leurs développements).[306] Ce complexe créé avec le sidérophore peut ensuite être internalisé par les bactéries et ainsi inhiber leurs proliférations, comme avec le Pseudomonas aeruginosa.[307]

Une activité antibactérienne sur cette même bactérie a également été décrite avec le GaM sur un modèle murin.[308] De plus, il est apparu que ce complexe a majoritairement été étudié en étude préclinique pour son potentiel antimicrobien. Diverses études ont été menées sur un large

spectre d'agents infectieux comme le Mycobacterium tuberculosis, le Mycobacterium avium,[309] le Pseudomonas aeruginosa,[308] le Staphylococcus aureus, le Staphylococcus epidermidis,[310] l'Acinetobacter baumannii,[308] et le Rhodococcus equi.[311]

La majorité de ces données précliniques met en évidence l'efficacité des composés galliés en tant qu'agents antimicrobiens. Des essais cliniques sont par ailleurs menés avec le citrate de gallium (Panaecin™) pour le traitement de certaines infections (P. aeruginosa et B. cepacia).[312]

2.2.4. Activité antinéoplasique

La capacité du gallium-67 à se localiser dans les cellules cancéreuses a permis aux chercheurs d'étendre les études sur l'activité antinéoplasique des composés galliés. Des essais cliniques de phase I et II sur le nitrate de gallium ont été menés auprès de patients dont le cancer avait rechuté ou progressé avec un traitement conventionnel.[313–315] Le nitrate de gallium a montré une activité antinéoplasique prometteuse pour le traitement du carcinome urothélial, du carcinome de la vessie et de lymphomes non Hodgkinien.[316–318] Pour ce dernier, les nombreux essais cliniques de phase II ont confirmé l'efficacité de cette molécule active dans le traitement de lymphome qu'elle soit administrée seule ou en combinaison avec d'autres médicaments.[317,318] Plus récemment, lors d'une étude clinique de phase II, le nitrate de gallium administré en infusion continue a démontré son efficacité pour des patients en rechute d'un lymphome.[319] Cet essai a montré qu'environ 30 % des patients ont répondu au traitement gallié alors que les traitements conventionnels de chimiothérapie et de greffes de cellules-souches n'avaient eu aucun impact.

Une étude in vitro a mis en évidence la capacité d'inhibition du maltolate de gallium sur la prolifération cellulaire de lymphome et induisant de surcroît l'apoptose des cellules cancéreuses.[320] Cette propriété s'est avérée plus efficace dans le cas du GaM que dans celui du nitrate de gallium puisque le GaM est intégré plus largement dans les cellules. Néanmoins aucune étude in vivo n'a permis de confirmer ces observations.

2.2.5. Effet sur l'hypercalcémie d'origine maligne

Les études ayant démontré une activité antinéoplasique du nitrate de gallium ont également montré qu'un nombre significatif de patients traités par ce dernier ont développé une hypocalcémie.[321] En conséquence, ces résultats ont poussé les chercheurs à examiner les effets du gallium sur l'hypercalcémie d'origine maligne.

Plusieurs études in vitro et in vivo ont montré que le gallium avait tendance à s'accumuler dans les métaphyses et la diaphyse de l'os. Cet élément engendre alors une modification de la solubilité du tissu osseux, augmentant sa résistance vis-à-vis de la résorption.[322,323] Selon ces auteurs, les mécanismes mis en jeu diffèrent en fonction du degré de maturation de la phase minérale de l'os. En effet, lorsque le gallium est introduit lors d'une étape précoce de minéralisation, ce dernier se lie à la matrice osseuse par substitution d'un atome de calcium. Cet échange occasionne, par la suite, une modification de la configuration des cristallites bloquant ainsi leur croissance. Dans le cas où le gallium est ajouté aux stades ultérieurs de la minéralisation, ce dernier est adsorbé à la surface des cristaux d'apatite puisque l'environnement local de la phase minérale de l'os n'a pas été affecté. Cette association empêche ainsi la maturation de la phase minérale.

Les bisphosphonates étant le traitement privilégié dans les cas de résorption osseuse, des études ont alors comparé leur efficacité avec celle du nitrate de gallium.[324,325] Il est ressorti, sur un essai clinique, que 82 □ des patients (atteints d'un cancer) ont une calcémie normale avec le traitement à base de nitrate de gallium comparé à 43 □ avec l'étidronate.[326] Au regard de ces résultats, le nitrate de gallium, commercialisé sous le nom de Ganite®, a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de l'hypercalcémie d'origine maligne. La dose recommandée est de 200 mg/m^2/j pour une durée de 5 jours consécutifs. La dose quotidienne de nitrate de gallium est diluée dans 1 L d'une solution soit de NaCl à 0,9 □ USP (United States Pharmacopeia) soit de dextrose à 5 % USP puis administrée par voie veineuse sur 24 h. De plus, pour les patients présentant une hypercalcémie légère et peu de symptômes, la dose peut être réduite à 100 mg/m^2/j.

Par ailleurs, la capacité du nitrate de gallium à diminuer l'hypercalcémie a été reconnue comme bénéfique pour les patients atteints de la maladie de Paget, une maladie entraînant un remodelage anormal du tissu osseux.[327] Pour des patients atteints de myélomes multiples et de métastases osseuses, l'ostéolyse des os a pu également être atténuée permettant de ce fait de limiter le risque de fractures chez ces patients ainsi que la douleur.[328]

3. Intégration de gallium au sein d'un biomatériau osseux

Le potentiel thérapeutique du gallium nous a conduits à concevoir des biomatériaux chargés en gallium. Un premier axe avait pour but d'intégrer le gallium au sein d'un ciment phosphocalcique[329] et le second fut axé sur le processus de remodelage osseux après une implantation d'une céramique galliée ainsi que sur l'activité antitumorale du gallium.[330]

3.1. Le gallium et les ciments phosphocalciques

Dans les années 2000, une étude in vitro[323] a montré que le gallium interagissait avec la phase minérale selon deux mécanismes soit par substitution de l'atome de calcium pendant la phase initiale de minéralisation soit par adsorption sur la surface de l'HA entachant ainsi sa maturation.

Les travaux de notre équipe[329] visaient à intégrer l'ion gallium (III) aux phosphates de calcium par voie de synthèse : (i) par substitution d'un atome de calcium dans la maille du β-TCP et (ii) par chimisorption sur de la CDA. Certains composants de la phase solide du ciment ont ensuite été remplacés par leur analogue dopé. Ainsi, le gallium a été incorporé par le remplacement soit de 13 % d'α-TCP par du β-TCP dopée au gallium soit de la CDA par celle dopé au gallium, le but étant de conserver des temps de prise appropriés [329]. Néanmoins quelle que soit la voie d'intégration, les ions gallium ne peuvent être associés que jusqu'à 0,3 % en masse par rapport à la phase solide. Il est apparu également que l'ajout de ce composé dans la formulation du CPC n'interfère pas dans les propriétés texturales du biomatériau.

Les expériences in vitro, ont montré une quantité faible de gallium libérée pour les deux formulations. Toutefois, l'ensemencement de cellules murines RAW 264.7 à la surface des biomatériaux a augmenté significativement la libération du gallium. Néanmoins, elle reste toujours trop faible (0,001 % du gallium total). Cette information permet ainsi, d'envisager une libération in vivo du gallium plus importante que celle mesurée dans les conditions in vitro.

Lors de l'implantation in vivo des substituts osseux dans un défaut de taille critique dans le condyle fémoral latéral de lapin, les résultats ont montré que les CPCs dopés en gallium sont parfaitement ostéointégrés avec un début de remodelage osseux. Les études histologiques n'ont également montré aucun effet délétère pour les deux formulations de ciments galliés. Néanmoins, l'implantation à court terme n'a permis de déceler aucune différence significative avec le CPC contrôle, ce qui nécessite une étude à plus long terme avec des modèles animaux

spécifiques présentant soit une ostéopénie, soit des tumeurs osseuses où la participation des ions gallium libérés par les CPCs auraient un impact sur la régénération osseuse.

La faible quantité du gallium introduite dans le CPC s'avère être la cause principale de la non observation des effets thérapeutiques du gallium in vivo. C'est cette hypothèse qui a alors été étudiée dans la thèse suivante.[24]

3.2. Le gallium et les céramiques phosphocalciques

Dans le cadre de cette étude, [330] la CDA dopée en gallium synthétisée selon l'étude précédente[329] a été utilisée. Les propriétés biologiques de cette céramique soit seule soit intégrée dans un CPC ont été étudiées.

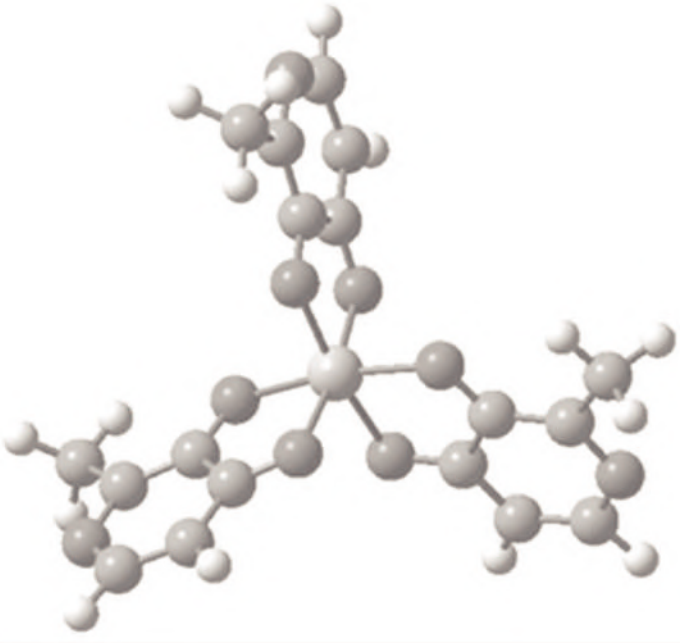
Dans une première partie, les propriétés de reconstruction osseuse ont été étudiées in vivo avec un modèle de défaut fémoral critique chez le rat. Le comblement a été effectué avec les biomatériaux (CPC et CDA) chargés en gallium et leur contrôle (sans gallium). À l'image des résultats obtenus précédemment,[23] le CPC chargé en gallium n'a montré aucun effet significatif sur la repousse osseuse comparé au CPC contrôle, dû à la quantité insuffisante de gallium libéré. Les microparticules de CDA chargées avec 3 % de gallium ont donc été utilisées dans le but d'augmenter cette concentration libérée sur le site d'implantation. Dans cette expérimentation, la CDA chargée en gallium a montré une augmentation de la formation osseuse ainsi que la quantité de collagène fibrillaire par rapport à la CDA contrôle. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la quantité du gallium peut avoir des effets bénéfiques sur la reconstruction osseuse et permet ainsi d'établir une preuve de concept illustrant l'avantage de cette association.

Dans la seconde partie, les effets antitumoraux ont été testés in vitro sur un modèle de métastase osseuse en utilisant une co-culture d'ostéoclastes et de cellules cancéreuses humaines agressives. Cette dernière fut sélectionnée pour sa capacité à envahir le tissu osseux. Les études ont montré que l'ion gallium réduisait la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que leur viabilité. L'activité ostéoclastique excessive induite par les cellules cancéreuses a également été réduite. Pour finir, il a été démontré que le gallium modulait l'expression de plusieurs gènes marqueurs impliqués dans l'activité tumorale des cellules cancéreuses. En conséquence, cette étude a permis de démontrer le potentiel de l'ion gallium qu'il serait intéressant d'associer avec un biomatériau dans le but de reconstruire le tissu osseux après une résection tumorale.

Pour résumer, le gallium lorsqu'il est intégré en quantité suffisante dans un biomatériau génère des effets bénéfiques sur la repousse osseuse. De plus, cette étude a également démontré un potentiel antitumoral du gallium qui pourrait, une fois intégré dans un biomatériau, lors d'une résection tumorale (i) inhiber la prolifération et l'activité des cellules cancéreuses restantes sur le site (ii) avoir un effet bénéfique sur l'hypercalcémie et (iii) promouvoir la reconstruction osseuse.

Le travail de recherche présenté dans le chapitre suivant consiste en (i) la formulation et la caractérisation physico-chimique d'un CPC chargé en maltolate de gallium (ii) la formulation d'un CPC chargé en caséine pouvant modifier a posteriori la cinétique de libération du complexe gallié et (iii) la formulation d'un CPC chargé en caséine permettant de moduler la cinétique de libération du maltolate de gallium.

Partie A : Synthèse et caractérisations physico-*chimiques d'un ciment PCa gallié*



1. Synthèse du maltolate de gallium

Le maltolate de gallium est un complexe formé à partir de nitrate de gallium et de maltol. Dans cette partie nous étudierons les réactifs de départ, en particulier la teneur en eau du nitrate de gallium, et la pureté du complexe de gallium obtenu.

1.1. Dosage de la teneur en eau des réactifs de départ

Le nitrate de gallium utilisé dans cette synthèse est composé de neuf molécules d'eau dans sa sphère d'hydratation, néanmoins le nombre de molécules d'eau tend à varier en fonction du temps, de la température ainsi que de l'hygrométrie. Cette évolution constitue alors une source majeure d'incertitude lors de la pesée de ce réactif ainsi que dans le calcul du rendement.

La teneur en eau du nitrate de gallium a été mesurée à l'aide d'un titrateur Karl Fisher DL38 grâce à un titrage réalisé par volumétrie. Le principe de cette méthode repose sur la réaction de l'iode avec l'eau selon l'équation suivante :

$$I_2 + SO_2 + 2H_2O = 2HI + H_2SO_4$$

L'appareillage est composé d'un bol contenant du méthanol, dans lequel deux électrodes de platine sont plongées. Un courant de polarisation est appliqué entre les électrodes tout au long de l'expérience. Tant que la solution contenant l'iode délivré (via une burette à piston) réagit avec l'eau de l'échantillon les électrodes sont polarisées. Lorsque l'eau est entièrement consommée, l'iode se retrouve en excès et engendre une différence de potentiel qui met alors fin au titrage.

Avant de commencer le titrage en eau du nitrate de gallium, le titre de la solution en iode doit être vérifié. Par la suite la mesure a été réalisée trois fois pour chaque échantillon. L'appareil fournit le volume de réactif nécessaire à la consommation de la totalité de l'eau ainsi que le pourcentage en eau. Le nombre de molécule d'eau est déterminé selon l'équation suivante :

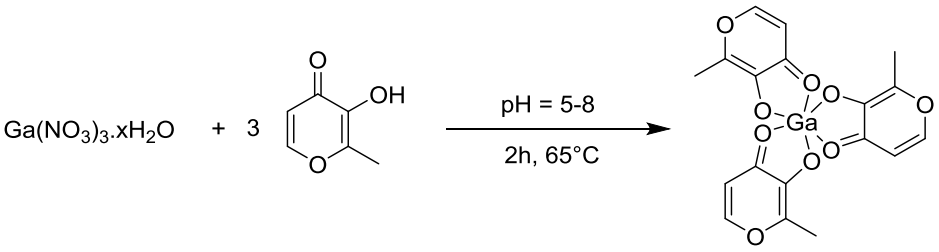
$$\%w(H_2O) = \frac{18x}{M(Ga(NO_3)_3, xH_2O)}$$

Avec $M(Ga(NO_3)_3, xH_2O) = 255{,}72 + 18x$

Pour la synthèse décrite ci-après, les différents nitrates de gallium utilisés contiennent entre 10 et 11 molécules d'eau.

1.2. Synthèse

La synthèse du maltolate de gallium a été réalisée à partir de la publication de Bernstein.[296] Concrètement, le complexe est préparé en mélangeant des solutions aqueuses de maltol à 0,5 mol.L^{-1} (Sigma aldrich) et de nitrate de gallium hydraté à 1 mol.L^{-1} ($Ga(NO_3)_3.xH_2O$, ACROS Organics) dans des proportions équivalentes à un rapport molaire 3:1 (maltol:gallium). Par la suite, du Na_2CO_3 sous forme solide est ajouté lentement afin d'obtenir un pH final entre 7 et 8, le but étant d'obtenir la précipitation du GaM. La solution est ensuite chauffée à 65 °C pendant 2 h. Le précipité résultant de cette synthèse est une poudre cristalline de couleur blanche à beige pâle. Après un refroidissement dans un bain de glace, le solide est filtré sur millipore (filtre PTFE de 0,22 µm) et purifié par des lavages successifs d'eau et d'éthanol. Pour finir, le complexe est chauffé au reflux dans de l'éthanol à 80 °C puis filtré, lavé avec de l'éthanol et séché. Le rendement final est de ~ 60 %.



1.3. Vérification de la pureté du GaM

Dans le but de confirmer la pureté du produit obtenu, des analyses ont été réalisées : analyse élémentaire (C, H), RMN-^{1}H et ^{13}C, spectroscopie d'absorption atomique (AAS), UV-visible, pDRX, IRTF. Ainsi les résultats obtenus pour les différentes analyses sont les suivantes :

- Analyse élémentaire,

  C % : 48,34 ± 0,58 (th : 48,58) et H % 3,40 ± 0,06 (th : 3,40),

- RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d6), δ (ppm),

  2,35 (s, 3H, CH3), 6,78 (d, J3=5,12 Hz, 1H, -CH-C=O), 8,32 (d, J3=5,12 Hz, 1H, -C-O-C-CH),

- RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d6), δ (ppm),

  14,77 (CH3), 108,65 (-CH=CH-C=O), 149,07 (-C-O-C-(CH3)), 151,14 (-C-O-Ga), 155,71 (-O-CH=C(CH3)), 175,07 (-C=O),

- AAS,

  Pour une solution de GaM préparée à 10 ppm, nous avons mesuré une absorbance relative d'une solution à 10,2 ± 0,1 ppm soit une erreur relative de 2,0 ± 1,0 %.

- UV-visible,

  Des larges pics d'absorption sont mesurés à 217, 250 et 306 nm en cohérence avec le spectre décrit dans la littérature.[296]

- pDRX,

  Le diagramme de diffraction (Figure 76) correspond à celui rapporté précédemment,[331] de plus aucune raie de diffraction pour des phases cristallines autres que le maltolate de gallium n'a été observée. Pour la suite de l'étude, les raies intenses situées à 9,56 ; 12,89 ; 14,73 et 23,12° 2θ seront considérées comme les raies représentatives du complexe GaM.

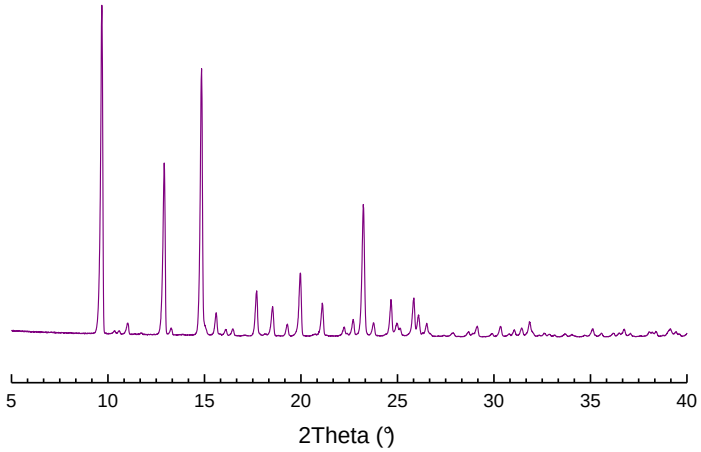


Figure 76 : Diffractogramme du GaM

- IRTF,

  Le spectre IRTF (Figure 77) correspond au spectre caractéristique du complexe. Dans certaines publications,[296,332] les auteurs attribuent des bandes de vibration comme la vibration des CH aromatiques à 3070 cm^{-1}, la vibration des groupements alkyl à 2910 cm^{-1}, la vibration du groupement C=C à 1610 cm^{-1} et la vibration du groupement C=O à 1570 cm^{-1}. Hors la localisation de ces deux dernières vibrations reste critiquable. En effet, selon une publication qui traite de la synthèse de complexes métalliques avec le ligand maltol, les auteurs assignent ces bandes de manière inversée.[333] Leur justification résulte de la coordination du maltol avec un ion métallique à travers l'atome d'oxygène du groupe carbonyle. En effet, une fois la liaison établie, la fréquence de vibration du groupement carbonyle diminue d'environ 50 cm^{-1} par rapport au ligand libre (situé à 1660 cm^{-1}). Il en est de même pour la vibration de la double liaison C=C.

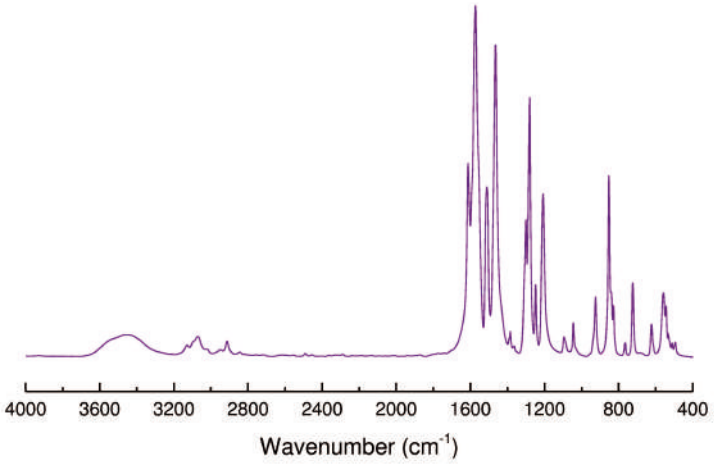
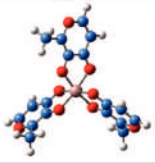
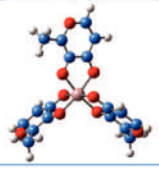
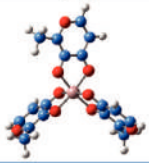
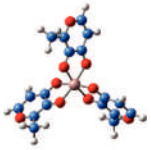
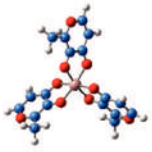
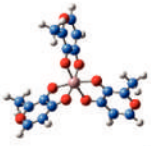
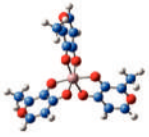
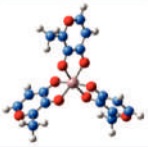
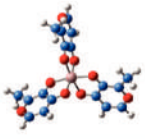


Figure 77 : Spectre IR du GaM

Dans le but d'obtenir une réponse sur la localisation IRTF des vibrations des groupements C=O et C=C, nous avons effectué une modélisation. Cette expérimentation a été effectuée à partir de la structure cristalline du GaM, répertoriée dans la base de données structurale de Cambridge, CSD[334] sous l'identifiant Refcode : GUYBAD,[296] qui a servi de structure de départ pour l'optimisation de géométrie en phase gazeuse. Celle-ci a été réalisée, à l'aide du logiciel Gaussian09,[335] par la méthode de fonctionnelle de la densité M06-2X[336] et la base de fonctions 6-31+G(d,p), suivie du calcul des fréquences de vibration au même niveau de théorie permettant une identification des vibrateurs. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 22 ci-dessous.

Tableau 22 : Résultats de la modélisation des bandes de vibration $\nu_{C=O}$ et $\nu_{C=C}$ du GaM

Vibration (cm^{-1})	1710	1698	1696	1679	1672	1666
Intensité	17	313	587	699	282	1046
Attribution	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$
Géométrie						
Vibration (cm^{-1})	1620	1613	1610			
Intensité	80	3	286			
Attribution	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$, $\nu_{C=O}$			
Géométrie						

Tout d'abord il est possible d'observer que toutes les vibrations situées entre 1710 et 1610 cm^{-1} sont attribuées aux deux groupements C=O et C=C. Ceci s'explique par le fait que la molécule de maltol soit un hétérocycle et que lorsqu'une vibration a lieu au sein de la molécule cette dernière résonne dans le cycle faisant participer plusieurs groupements à la fois. Par exemple pour la vibration à 1666 cm^{-1}, les groupements intervenant majoritairement sont la C=O couplé de manière symétrique avec la C=C (2) et en minorité la C=C (1) qui vibre en symétrie avec la C=C(2). Les attributions C=C (2) et C=C (2) sont données sur la Figure 78 A.

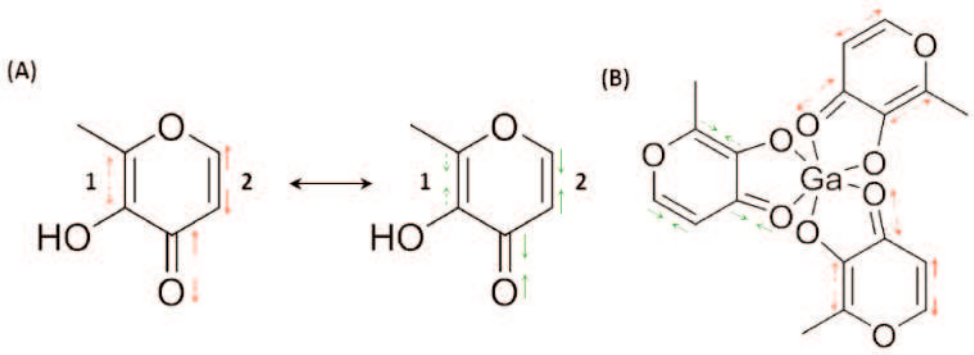


Figure 78 : Impact de la vibration à 1666 cm^{-1} (A) sur le maltol et (B) sur le GaM

L'intensité des bandes de vibration dépend des types de contribution. Par exemple, la contribution des trois ligands en symétrie dans le cas de la bande à 1710 cm^{-1}, engendre une faible intensité alors que pour la contribution de deux ligands en antisymétrie dans le cas de la raie à 1666 cm^{-1} (Figure 78 B), une intensité forte est générée.

Pour finir, les écarts observés entre les valeurs théoriques et expérimentales sont dus à (i) l'environnement puisque la modélisation est effectuée dans le vide et à (ii) l'anharmonicité qui diminue la vibration dans le cas des mesures expérimentales.

Pour conclure, le complexe de maltolate de gallium a pu être synthétisé et les caractérisations effectuées ont permis d'attester de la pureté du composé.

2. Formulation du ciment chargé en maltolate de gallium

Les formulations de ciments chargés en maltolate de gallium sont préparées à partir du même ciment apatitique commercial (QuickSet, Graftys SA) décrit au chapitre II partie 1.1. Le complexe de gallium est directement ajouté sous forme de poudre à la phase solide du ciment à 3,5 et 7 % en masse. Les mélanges sont, par la suite, homogénéisés à l'aide d'un agitateur

tridimensionnel pendant 1 h à une vitesse de 50 tr/min. Une fois cette étape réalisée, la pâte de ciment est préparée en gâchant la poudre avec une solution de durcisseur à 0,5 % Na_2HPO_4 avec un rapport L/P = 0,45.

Les CPCs sont référencés selon les dénominations suivantes :

- CPC-3,5G pour la formulation d'un ciment combiné avec 3,5 % de GaM,
- CPC-7G pour la formulation d'un ciment combiné avec 7 % de GaM.

3. Étude des propriétés physico-chimiques de CPCs chargés en GaM

La formulation du ciment et du maltolate de gallium peut engendrer des modifications tant dans les propriétés texturales lors de la réaction de prise qu'au niveau des caractéristiques finales du CPC. Ainsi, dans cette partie sera étudiée l'influence du complexe de gallium sur (i) la nature du produit final du biomatériau (ii) les propriétés texturales du CPC et (iii) les propriétés structurales de ce dernier. Les échantillons de ciments combinés en gallium utilisés dans le cadre de cette étude sont référencés dans le Tableau 23 ci-dessous.

Tableau 23 : Résumé des différents échantillons utilisés *dans l'étude d'un CPC combiné avec un* complexe de gallium

Nature du produit obtenu après prise				
Nom	**Ciment**	**Principe actif**	**Conditions de prise**	**Analyses**
CPC	GQS	/	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	pDRX*, IRTF*, RMN ^{31}P*
CPC-3,5G	GQS	GaM, 3,5 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
CPC-7G	GQS	GaM, 7 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
Propriétés texturales				
CPC	GQS	/	/	Ti Injectabilité Travaillabilité Cohésion
CPC-3,5G	GQS	GaM, 3,5 % w:w	/	
CPC-7G	GQS	GaM, 7 % w:w	/	
Propriétés structurales				
CPC	GQS	/	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	Résistance mécanique Pycnométrie* MEB*
CPC-3,5G	GQS	GaM, 3,5 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	
CPC-7G	GQS	GaM, 7 % w:w	37 °C, 72 h, dans NaCl 0,9 %	

* *arrêt du processus d'hydratation en plaçant les échantillons dans une étuve à 37 °C pendant* 1 semaine

3.1. Influence du maltolate de gallium sur la réaction de prise et le produit final

La nature du produit final obtenu de chaque formulation de ciment a été successivement étudiée par diffraction des rayons X, par infrarouge et par RMN ^{31}P du solide selon les protocoles expérimentaux décrits dans le chapitre II.

Les diffractogrammes (Figure 79) entre le CPC contrôle et le CPC-7G sont semblables avec les raies représentatives de la CDA, de l'α-TCP et du DCPA. L'observation de la CDA dans les différents ciments prouve que la réaction d'hydrolyse a bien eu lieu. De plus, les raies d'α-TCP indiquent que la réaction n'est pas totale et son avancement ne semble pas avoir été modifié par l'ajout du complexe de gallium. Il est également possible d'observer sur le diffractogramme du CPC-7G les raies représentatives du GaM à 9,56 ; 12,89 ; 14,73 et 23,12° 2θ qui indiquent que le complexe est encore présent après 72 h de prise dans NaCl.

L'analyse IRTF (Figure 80) confirme également la présence de CDA après la prise du ciment pour le ciment contrôle et les ciments chargés en GaM (3,5 et 7 %). Nous observons alors les bandes représentatives de l'eau entre 3500 - 3000 cm^{-1} et 1700 - 1600 cm^{-1}, celles représentant les vibrations des groupements PO_4^{3-} situées entre 1200 - 950 cm^{-1} et 650 - 500 cm^{-1}, celles des vibrations des groupements HPO_4^{2-} de l'apatite entre 900 - 800 cm^{-1} et pour finir, la bande du groupement hydroxyle de l'hydroxyapatite à 3570 cm^{-1}.

Les bandes représentatives du GaM sont également observables sur chaque spectre des CPCs chargés en complexe entre 1700 - 1200 cm^{-1} ainsi que vers 900 cm^{-1}. La localisation de ces bandes représente respectivement les vibrations de groupement carbonyle, des doubles liaisons C=C et des liaisons C-H. Ces emplacements sont en accord avec le spectre IR du complexe pur.

L'analyse par RMN ^{31}P à l'état solide (Figure 81 A) permet de mettre en évidence la présence de CDA (composé d'un pic à 3,1 ppm) et de DCPA (composé de 2 pics à -0,2 et -1,5 ppm) pour les deux ciments (contrôle et chargé en GaM). La déconvolution (Figure 81 B) des spectres réalisés permet d'obtenir la proportion en CDA au sein du biomatériau. Le pourcentage de CDA obtenu est alors de 68 % pour le CPC contrôle ainsi que pour le ciment chargé en GaM.

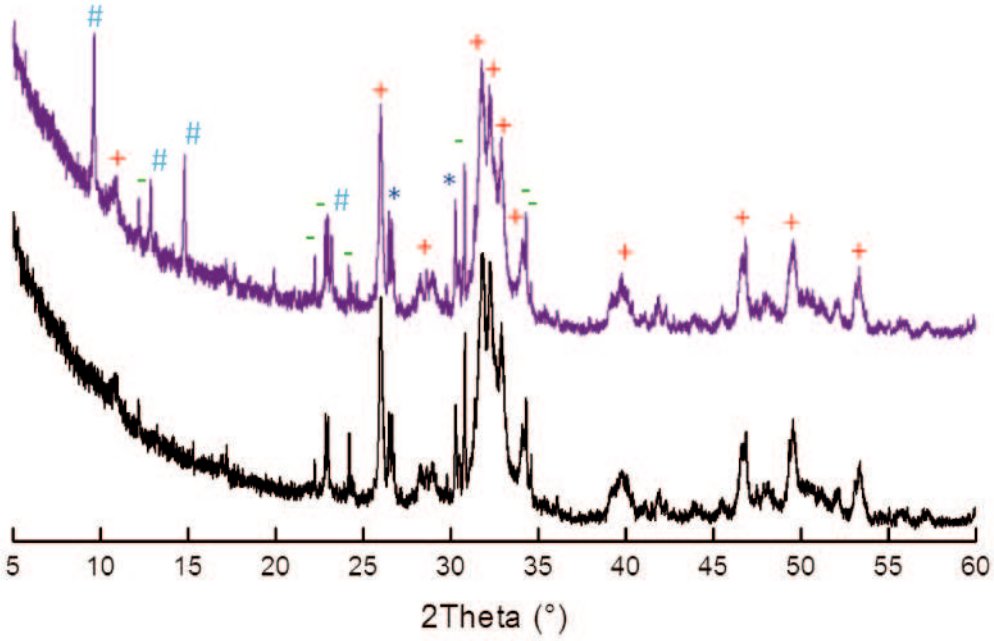


Figure 79: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-7G (violet), + *pic de l'apatite*, - *pic de l'α*-TCP, * pic de la monétite et # pic du GaM

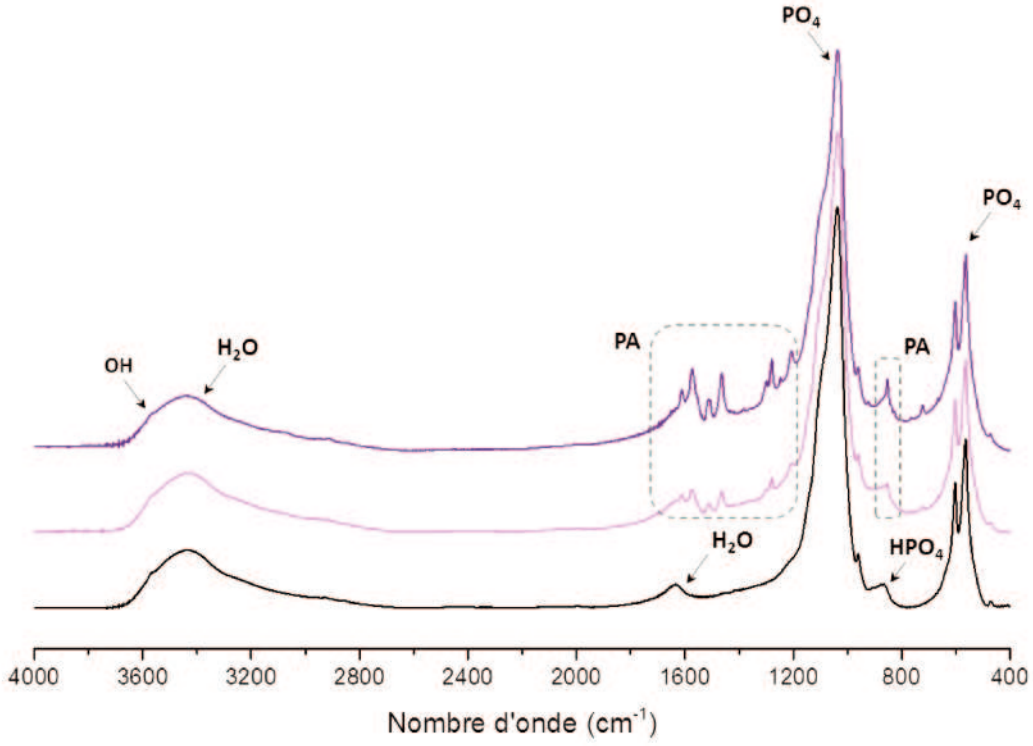


Figure 80 : Spectres des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-3,5G (rose), le CPC-7G (violet) et - - - zone de visualisation du PA

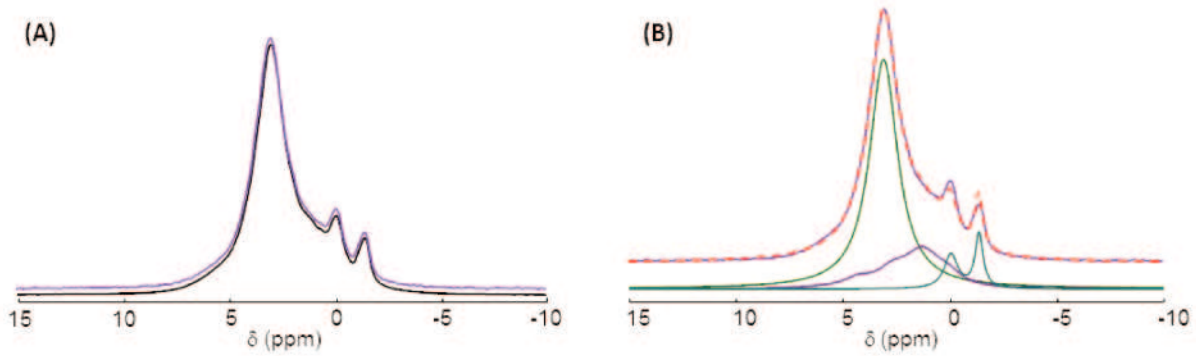


Figure 81 : (A) Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir) et le CPC-7G (violet) (B) Déconvolution du spectre RMN MAS ^{31}P du CPC-7G (rouge) avec la CDA (vert), *l'α*-TCP (violet) et le DCPA (bleu)

Pour résumer, les analyses pDRX, IRTF et RMN ^{31}P du solide sont des méthodes complémentaires permettant l'étude de la nature du produit final obtenu de nos formulations de CPCs. Il est observable que l'ajout du complexe du maltolate de gallium n'altère pas la prise du ciment ainsi que l'obtention de la CDA finale puisque la quantification de cette dernière a donné des taux de transformations identiques soit 68 %.

3.2. Influence du maltolate de gallium sur les propriétés texturales du CPC

Les propriétés texturales sont essentielles pour un ciment phosphocalcique injectable, le temps de prise, l'injectabilité, la travaillabilité et la cohésion ont donc été étudiées dans cette partie (Tableau 24) selon les protocoles décrits dans le chapitre II à une température de 20 ± 1 °C. Ainsi, les temps de prise obtenus sont respectivement de 5,30 à 6 min pour le CPC contrôle et le CPC-3,5G et de 5 à 5,30 min pour le CPC-7G. Il y a donc aucune différence significative entre les temps de prise des CPCs chargés en gallium et le CPC. Par conséquent, l'association du GaM ne modifie pas le temps de prise du ciment et ceci quelle que soit la proportion (3,5 et 7 % en masse) de complexe ajouté.

Tableau 24 : Résumé des propriétés texturales des différentes formulations de ciment charge en GaM

	CPC	**CPC-3,5G**	**CPC-7G**
L/P	0,45	0,45	0,45
t_i (min)	5,30 - 6	5,30 - 6	5 - 5,30
Injectabilité à 3 min (N)	10,4 ± 0,2	6,6 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Cohésion	Oui	Oui	Oui

Dans le but d'injecter manuellement les différentes formulations de CPCs chargés en GaM, des tests d'injectabilité ont été réalisés. Les résultats obtenus à 3 min montrent une différence entre le CPC contrôle et les ciments chargés en GaM, ces derniers étant plus injectables. Cette modification peut provenir de plusieurs facteurs, décrits chapitre I. Dans cette partie, seule la granulométrie de la poudre est différente et provient de l'ajout des grains de GaM (photographies MEB page 162). En théorie, une augmentation de la taille des grains engendre une diminution de l'injectabilité,[337] alors que nos essais montrent une augmentation de ce paramètre. À l'heure actuelle, notre seule hypothèse est que ce changement provient du ligand, le maltol. Cependant aucun article ne fait état d'une propriété rhéofluidifiante du maltol puisque ce dernier est utilisé soit en tant qu'exhausteur de goût[338] soit pour augmenter la biodisponibilité dans l'organisme de certains métaux comme le fer, l'aluminium ou le gallium.[296] De plus, l'injectabilité entre les deux CPCs chargés n'est pas affectée par la proportion en GaM.

La travaillabilité (Figure 82) a été étudiée avec un lot de ciment différent du lot utilisé pour l'analyse des autres propriétés texturales ainsi qu'avec une température moyenne de 26 ± 1 °C. Dans ces conditions, ce CPC possède un temps de prise de 8 min. L'injectabilité du ciment contrôle diminue au fur et à mesure du temps en cohérence avec le temps de prise de ce dernier (8 min). L'ajout du GaM permet une injectabilité prolongée du ciment puisqu'à 8 min. A ce temps, l'injectabilité de ce dernier est de 13,1 ± 1,3 N et se situe en dessous de la limite d'injectabilité manuelle.

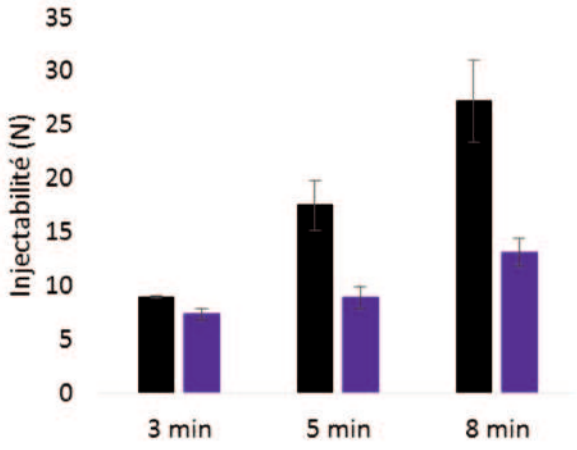


Figure 82 : Injectabilité des ciments CPC (noir) et CPC-7G (violet) en fonction du temps (3, 5 et 8 min)

La cohésion des ciments chargés a également été vérifiée visuellement (i) immédiatement après l'entrée du ciment dans la solution de NaCl et (ii) après une semaine de prise dans cette même solution conservée à 37 °C. L'examen visuel n'a montré aucune différence entre les ciments qui sont restés cohésifs.

3.3. Influence du maltolate de gallium sur la structure du biomatériau

À l'image des résultats obtenus avec les ciments chargés en analgésique, les ciments chargés en GaM possèdent une résistance mécanique (26,6 ± 1,3 et 26,8 ± 0,5 MPa pour le CPC-3,5G et CPC-7G respectivement) significativement plus faible que celle du CPC contrôle (31,1 ± 0,3 MPa), Figure 83. De plus, l'allure des courbes de résistance en compression montre une rupture nette au sommet de la courbe typique d'un matériau fragile. Cette caractéristique sera détaillée dans la partie B de ce chapitre. Nous avions vu précédemment que ce genre de diminution pouvait provenir d'un facteur comme une augmentation de la porosité, une interaction entre le PA et le CPC interférant avec la cristallogenèse ou un emprisonnement des grains du PA qui provoque des fractures préférentielles dans le matériau.

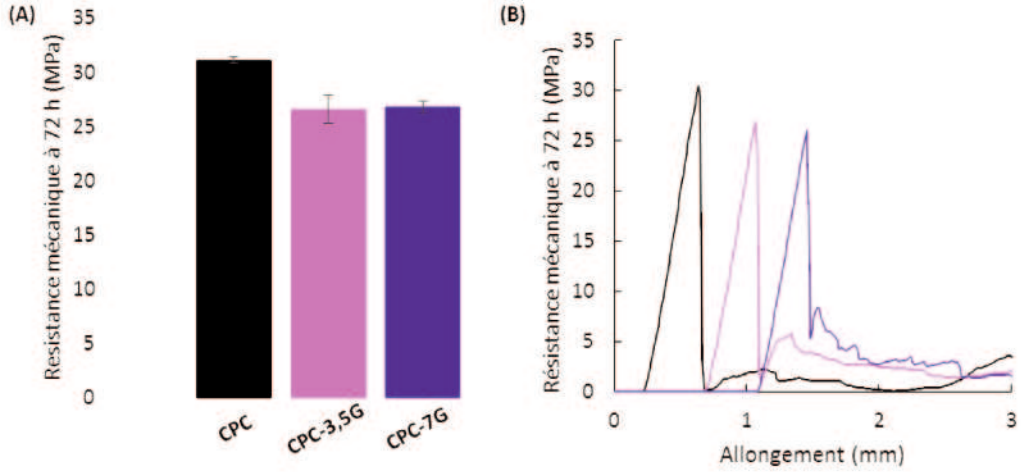


Figure 83 : Propriétés mécaniques des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C avec (A) la résistance à la compression des ciments et (B) les courbes de compression des ciments

La porosité étudiée par pycnométrie hélium a donné les résultats ci-dessous (Tableau 25) soit une porosité d'environ 50 □ pour le CPC et le CPC-7G et 47 % pour le CPC-3,5G. Les analyses ont été réalisées sur un seul échantillon, nous ne pouvons pas attester de la différence entre le CPC-3,5G et les deux autres CPCs. Néanmoins, il est fort probable que cette différence ne soit pas significative.

Tableau 25 : Densités et porosités des différents CPCs chargés en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline

	CPC	**CPC-3,5G**	**CPC-7G**
L/P	0,45	0,45	0,45
ρ_{vraie} (g/cm^3)	2,61	2,64	2,60
Porosité à 72 h (%)	49,5	47,0	49,9

La Figure 84 présente la microstructure des différentes formulations de CPCs chargés en GaM comparé au ciment contrôle après 72 h de prise dans une solution saline. À faible grandissement, une fracture nette est observée pour les trois matériaux attestant de leur caractère fragile. La surface est lisse pour l'ensemble des échantillons et comporte des bulles d'air emprisonnées pendant la prise du ciment. Ces dernières sont sphériques et possèdent un diamètre variant de 30 à 100 µm. Néanmoins, il apparaît que sur l'image du CPC-3,5G, le diamètre des bulles soit plus important (de 30 jusqu'à 150 µm), or nous savons que la porosité de cet échantillon est similaire aux autres CPCs. Il est alors possible que l'image réalisée ne soit pas représentative de l'échantillon ou que la répartition des pores soit différente dans cet échantillon vis-à-vis du ciment contrôle. À plus fort grandissement, les mêmes spécificités sont observées entre les CPCs chargés et le CPC contrôle. En outre, nous retrouvons les géodes caractéristiques de l'hydrolyse de l'α-TCP ainsi que l'enchevêtrement de cristaux apatitiques qui semble identique dans les trois types de CPCs. La préparation au crosspolisher permet de mettre en avant ces mêmes observations ainsi que l'interface entre la poudre de GaM et le ciment dont le détail sera fait a posteriori.

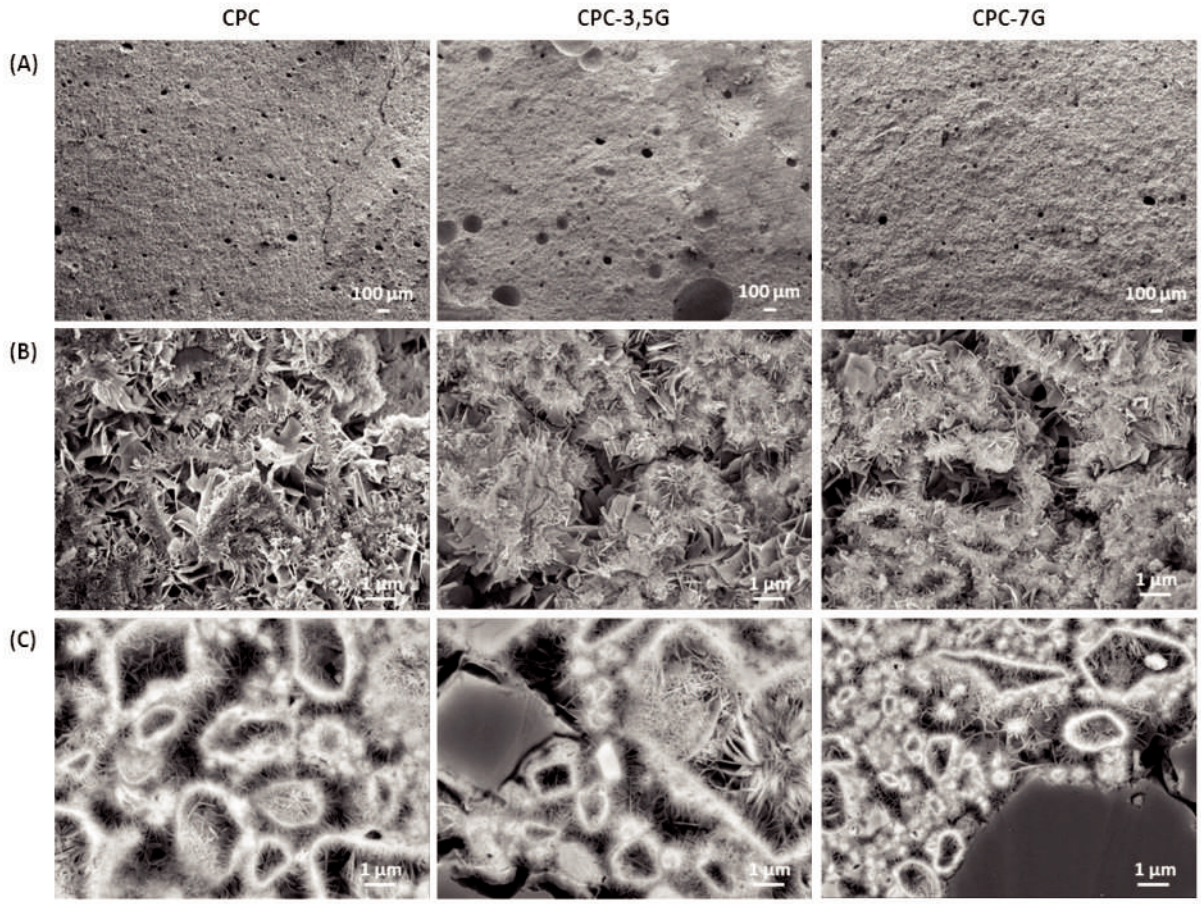


Figure 84 : Photographies MEB des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher

En conclusion, la combinaison d'un CPC et du complexe de GaM ne modifie pas drastiquement les propriétés usuelles du ciment commercial. En effet, seules les propriétés rhéologiques et mécaniques sont affectées par l'intermédiaire des cristaux du complexe de gallium piégés dans la pâte puis dans la structure du ciment pris. Néanmoins, ceci n'entache pas l'utilisation future du CPC.

4. Intégrité du malolate de gallium au sein du ciment

L'intégrité du GaM au sein du biomatériau a été étudiée par photographies MEB, cartographie EDX et par RMN ^{71}Ga du solide.

Les clichés MEB permettent d'étudier la morphologie du complexe après intégration. La Figure 85 présente la morphologie des cristaux de GaM avant l'association de ce dernier avec

le ciment à faible grandissement (A) et à plus fort grandissement (B). La poudre est constituée de grains de forme et de taille inhomogène (allant de quelques µm à 10 µm).

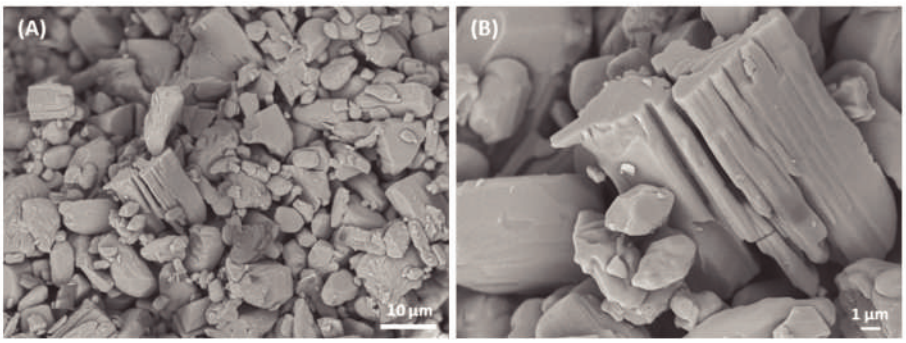


Figure 85 : Photographies MEB des cristaux de maltolate de gallium, (A) à faible grandissement et (B) à fort grandissement

Le CPC-7G (Figure 86 A) montre une répartition homogène du principe actif, qui se différencie grâce au contraste imposé par le mode d'acquisition, c'est-à-dire que plus l'élément est riche en électron et plus il ressortira clair. Ici, le gallium étant entouré d'un ligand organique, ce dernier s'avère moins riche en électron par rapport au CPC et ressort donc plus sombre. De plus, après intégration la taille des grains de GaM n'est pas modifiée, ce qui indique une bonne intégrité du complexe au sein du CPC (Figure 86 B). Pour finir, à fort grandissement (Figure 86 C), les grains de GaM sont totalement intégrés et piégés au sein du biomatériau. Aucune modification de la morphologie du GaM n'est observable.

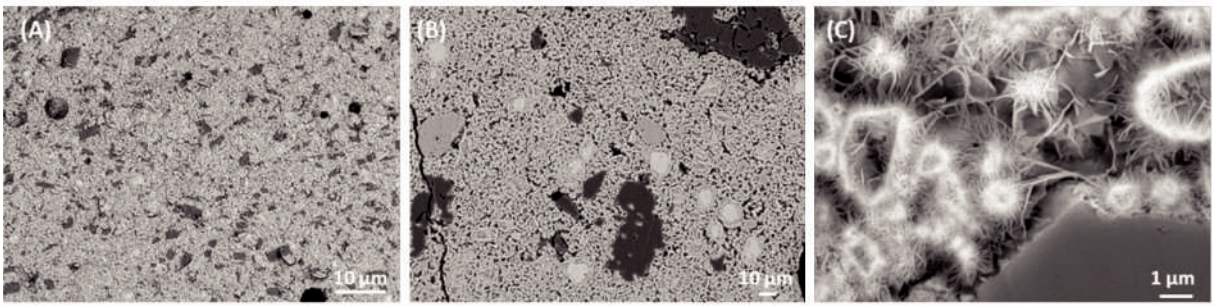


Figure 86 : Photographies MEB des ciments chargés en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à faible grandissement avec une préparation au crosspolisher et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher

Les photographies MEB ne faisant que ressortir la partie organique du complexe, une cartographie EDX a donc été réalisée afin d'observer le gallium. La cartographie EDX a été réalisée sur une fracture du CPC-7G métallisée par une fine couche de carbone. Elle a été acquise à l'aide d'un microscope JEOL JSM-5800LV. L'image MEB servant de base à l'acquisition a été enregistrée en mode électron secondaire avec un courant d'électron de

0,5 nA et une tension 15 kV (Figure 87 A). La cartographie a ensuite été effectuée sur une durée de 15 h. Les éléments phosphore, calcium et gallium seront analysés selon les raies Kα suivantes P Kα = 2,010 keV, Ca Kα = 3,692 keV et Ga Kα = 9,251 keV (Figure 87 B, C et D).

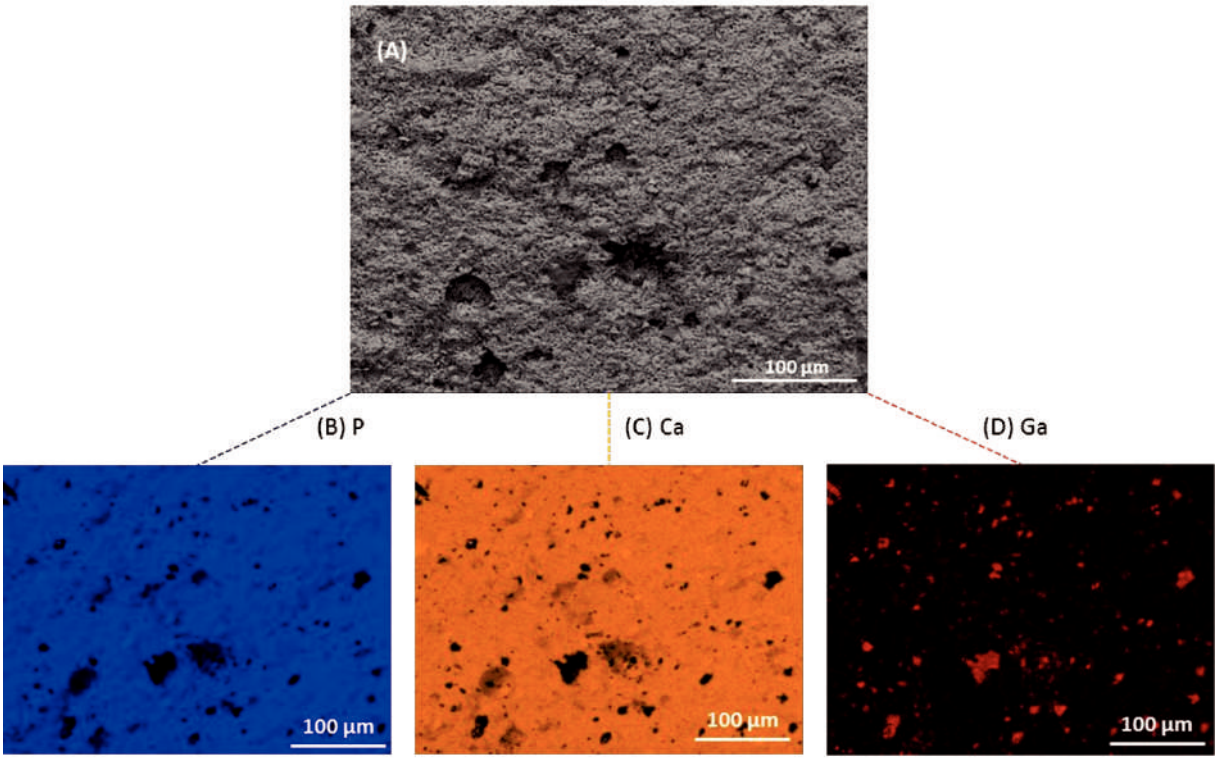


Figure 87 : (A) Photographie *MEB d'un CPC*-7G après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec une cartographie (B) phosphore (bleu), (C) calcium (jaune) et (D) gallium (rouge)

On observe ainsi que la cartographie du gallium est complémentaire avec celles du phosphore et du calcium, c'est-à-dire qu'il y a une répartition homogène du phosphore et du calcium sur la totalité de la surface excepté aux endroits où le gallium est présent. Cette analyse atteste ainsi la présence du gallium au sein de l'échantillon de CPC.

Dans le but de vérifier l'intégrité structurelle du complexe de gallium, des analyses en RMN du solide du gallium ont été réalisées avant et après association avec le CPC.
Les expériences RMN ^{71}Ga ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker Avance III 850 MHz (B_0 = 20 T, ν_{RF} ^{71}Ga = 259,3 MHz) avec une sonde de double résonance de 1,3 mm et une vitesse de rotation de 63 kHz. Les spectres MAS 1D ont été acquis avec une sous forme d'écho complet avec une séquence d'écho de Hahn utilisant des impulsions sélectives (longueur d'impulsion π/2 de 2,1 µs pour un champ RF de 62,5 kHz). Plus de 200 000 scans ont été accumulés avec un temps de recyclage de 1s. Les déplacements chimiques ^{71}Ga ont été

référencés par rapport à une solution de $Ga(NO_3)_3$ à 1 $mol.L^{-1}$. Les spectres ^{71}Ga MAS ont été déconvolués avec le programme Dmfit en utilisant des formes de raies typiques de l'interaction quadripolaire, caractérisées par un déplacement chimique isotrope (δ_{iso}), une constante de couplage quadripolaire (C_Q) et un paramètre d'asymétrie (η_Q).

Les CPCs chargés en GaM ont été préparés selon deux types de prises différentes soit (i) immergés 72 h dans une solution saline à 37 °C soit (ii) dans une étuve à 37 °C dont l'atmosphère a été saturée en eau. Le but est d'étudier les potentielles modifications provenant à la fois du mélange avec le liquide durcisseur lors de l'étape du gâchage du ciment et celles issues de la percolation de la solution de NaCl. La réaction de prise de chaque échantillon de ciment a été stoppée en mettant ces derniers dans une étuve à 37 °C pendant une semaine.

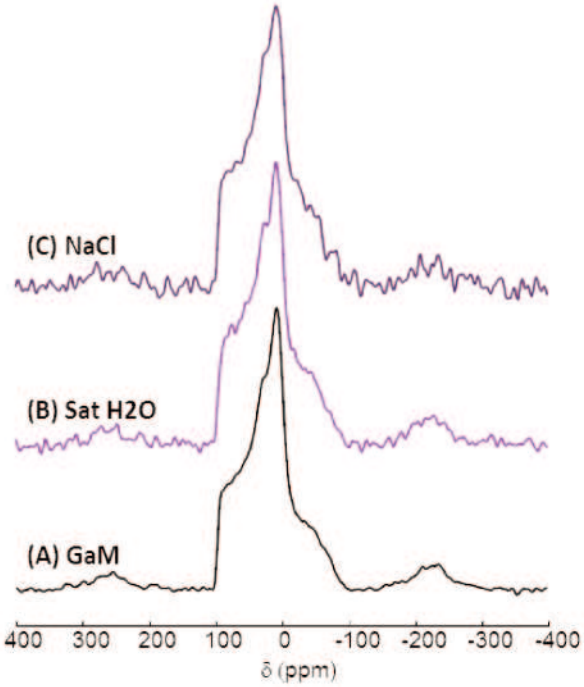


Figure 88 : Spectres RMN MAS ^{71}Ga (A) du maltolate de gallium pur, du CPC-7G après 72 h de prise à 37 °C (B) dans une étuve saturée en eau et (C) immergé dans NaCl

La Figure 88 représente le spectre RMN ^{71}Ga du maltolate de gallium ainsi que ceux du CPC chargé à 7 % en GaM. Ces trois spectres sont similaires en tout point, ce qui indique que le complexe de gallium ne subit pas de modification majeure (i) par le liquide durcisseur pendant l'étape de gâchage et (ii) par la percolation de la solution saline pendant les 72 h de prise. Ces résultats sont cohérents avec les observations MEB présentées ci-dessus.

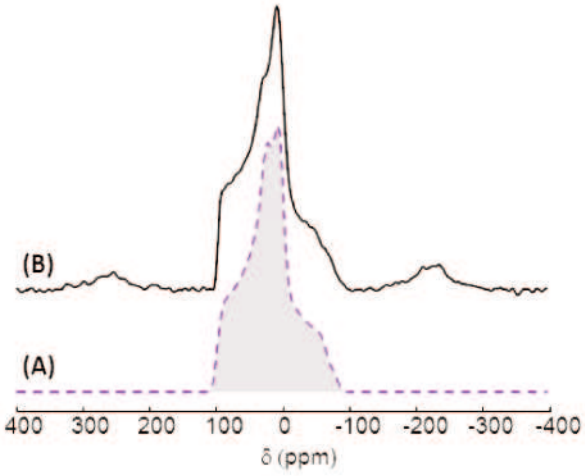


Figure 89: (A) Simulation et (B) spectre expérimental RMN MAS ^{71}Ga du maltolate de gallium

La simulation du spectre RMN ^{71}Ga du GaM a été réalisée à l'aide du logiciel Dmfit et est représentée sur la Figure 89 (A). Cette simulation présente un site unique de gallium, donc les caractéristiques sont les suivantes :

- Déplacement chimique isotrope : δ_{iso} = 98,4 ppm,
- Constante de couplage quadripolaire : C_Q = 13,28 MHz,
- Paramètre d'asymétrie : η_Q = 0,77.

De manière générale les déplacements chimiques d'un gallium en géométrie tétraédrique sont situés plus haut que pour les sites octaédriques.[339] Par exemple, pour un composé de type β-Ga_2O_3, le δ_{iso} prend la valeur de 198 ppm pour Ga_{IV} et 25 ppm pour Ga_{VI}. Néanmoins la valeur du δ_{iso} est entièrement dépendante de l'environnement chimique. Le maltol est un ligand bidenté de ce fait le complexe GaM possède une géométrie octaédrique, ainsi le déplacement chimique isotrope illustre donc la forme GaO_6. Dans la littérature, une étude portant sur la complexation du gallium avec un ligand organique, a montré un δ_{iso} de 125 ppm pour un environnement similaire à notre étude puisque le gallium est complexé par la fonction carboxyle du ligand.[340] Cette forme est également confirmée par les résultats pDRX précisant les longueurs Ga-O.

Pour conclure, les analyses structurelles (RMN ^{71}Ga) et morphologiques (MEB et EDX) ne présentent aucune modification visible après association du complexe avec le substitut osseux.

5. Études de la libération du maltolate de gallium in vitro

Une quantité (1,2 g) de ciment est utilisée (concentration de 3,5 et 7 % en masse de GaM et un rapport L/P de 0,45) dans le but de former trois pastilles (le protocole est similaire à celui décrit au chapitre II). Après une prise de 20 min à température ambiante, les pastilles sont démoulées, pesées et immergées dans une solution saline (0,9 % w/w, 10 mL). Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37 °C, elle-même placée sur un agitateur orbitalaire (90 tr/min).
Des prélèvements de 6 mL de la solution sont effectués régulièrement au cours de l'expérience et la quantité prélevée est immédiatement renouvelée par de la solution fraîche. Les solutions prélevées sont ensuite filtrées (PTFE, 0,45 µm) afin d'éliminer de potentielles particules de ciment qui pourraient altérer les mesures. Le Gallium libéré est analysé par AAS (UNICAM 989 SOLAAR Serie) et le complexe de GaM libéré est étudié par spectrométrie UV-visible. À la fin de la libération, les pastilles de CPCs sont dissoutes dans une solution de HCl à 5 % afin de doser la totalité du gallium intégré dans le biomatériau. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'anesthésique libéré (± la valeur maximale et minimale) en fonction du temps.

4.1. Étude de la libération du gallium

La spectroscopie d'absorption atomique est une méthode d'analyse qui permet de quantifier le gallium libéré de nos ciments chargés en GaM. Une gamme d'étalonnage (établie entre 1 et 100 ppm) a d'abord été préparée à partir d'une solution standard de nitrate de gallium pour AAS à 1000 ppm (Sigma Aldrich). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre UNICAM 989 SOLAAR Serie. Les conditions expérimentales pour cet appareil sont les suivantes : une longueur d'onde de 287,5 nm, une flamme d'air/acétylène, un débit de 1,2 mL/min et une hauteur du bruleur de 12,4 mm.

Les courbes obtenues pour le CPC-3,5G et le CPC-7G sont présentées ci-après (Figure 90). Deux étapes différentes sont observables (i) une libération flash dans laquelle 34 ± 1 et 28 ± 1 % de gallium ont été libérés par le CPC-3,5G et le CPC-7G respectivement et (ii) une libération qui augmente progressivement jusqu'à obtenir un palier de 48 ± 1 % à 60 jours pour le CPC-3,5G et de 58 ± 2 % à 116 jours pour le CPC-7G. À la fin des libérations, les pastilles de ciment sont dissoutes dans une solution de HCl à 5 % et le gallium restant est mesuré. Ainsi,

grâce cette dernière mesure nous retrouvons 94 ± 2 % de gallium initialement présents dans les deux formulations de ciment.

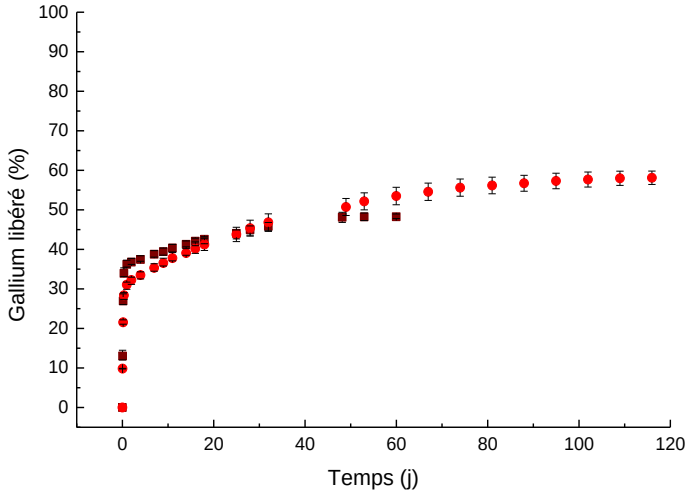


Figure 90: Libération du gallium en fonction du temps du CPC-3,5G (rouge foncé) et du CPC-7G (rouge)

Concernant la cinétique, il est impossible d'établir une corrélation entre les libérations et les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas. Néanmoins, il est possible de supposer que la libération flash provient exclusivement des extrémités du cylindre grâce à l'accessibilité plus importante du PA par les fluides. Cette hypothèse sera précisée à l'aide d'une cartographie raman dans la suite de la thèse.

4.2. Étude de la libération du maltolate de gallium

La quantification du complexe de gallium par spectroscopie UV-visible a également été réalisée afin d'attester de l'intégrité du PA libéré, ainsi une droite d'étalonnage (allant de 3 à 30 ppm) de l'analyte a été effectuée dans une solution de NaCl à 0,9 □ . La Figure 91 illustre les spectres UV obtenus du GaM en fonction de la concentration, un dégradé de bleu allant du plus foncé au plus clair correspond aux concentrations allant de 30 à 3 ppm. Il est alors possible d'observer que le pic du complexe à 306 nm diminue au profit du pic du maltol à 274 nm. À 292 nm, un point isobestique indique la présence en concomitance de deux espèces en solution. À faible concentration il est possible qu'une compétition entre les ions hydroxyles (provenant de l'eau) et le maltolate ait lieu et que le complexe se déligande. À forte concentration, c'est-à-dire pour une concentration supérieure à 20 ppm, ce phénomène n'est pas visible et le spectre observé est celui décrit dans la littérature.[296] Par conséquent, pour la suite des expériences, les spectres UV

de libération seront enregistrés pour une concentration fixe de 25 ppm en GaM. Le coefficient de corrélation linéaire pour la mesure UV du GaM est de 0,9995 à 292 nm.

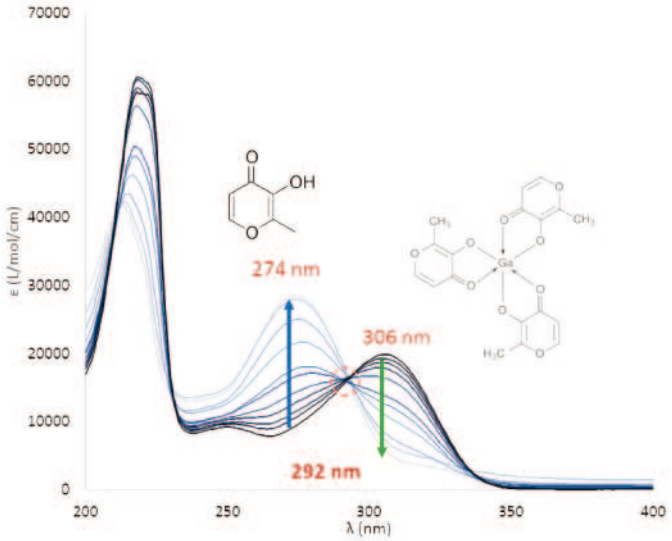


Figure 91 : Spectres UV du GaM *dans l'eau en* fonction de la concentration, de 3 (bleu clair) à 30 ppm (bleu foncé)

Les mesures UV ont été réalisées à partir des résultats obtenus par l'analyse AAS. La dilution des solutions a été effectuée de telle manière à obtenir un spectre UV représentatif d'une concentration à 25 ppm c'est-à-dire sans le phénomène de décomposition du complexe. La Figure 92 montre une évolution des spectres UV du CPC-7G en fonction du temps de libération. En effet, pour une concentration fixe en GaM (25 ppm), il est possible d'observer l'apparition d'un pic à 274 nm, celui du maltol. Une décomposition de chaque spectre a donc été réalisée à l'aide de la fonction solver du tableur Excel qui utilise des spectres de référence du maltol libre et du GaM à 25 ppm. À 1 h, le spectre expérimental et le spectre théorique de GaM ne sont pas significativement différents, il en est de même pour les spectres à 3 h et à 8 h. À partir de 1 j, l'apparition du pic représentatif du maltol est aperçue sur le spectre expérimental, cette observation est d'autant plus marquée pour les libérations suivantes (comme à 9 j). À la fin de la libération, la courbe expérimentale représente exclusivement la libération du maltol comme présenté sur la Figure 92 D à 110 j. Les courbes de libération du CPC-3,5G ne sont pas présentées mais les observations sont semblables. Par conséquent, le ligand maltol provenant des molécules de GaM restées piégé dans le CPC est libéré conjointement au GaM.

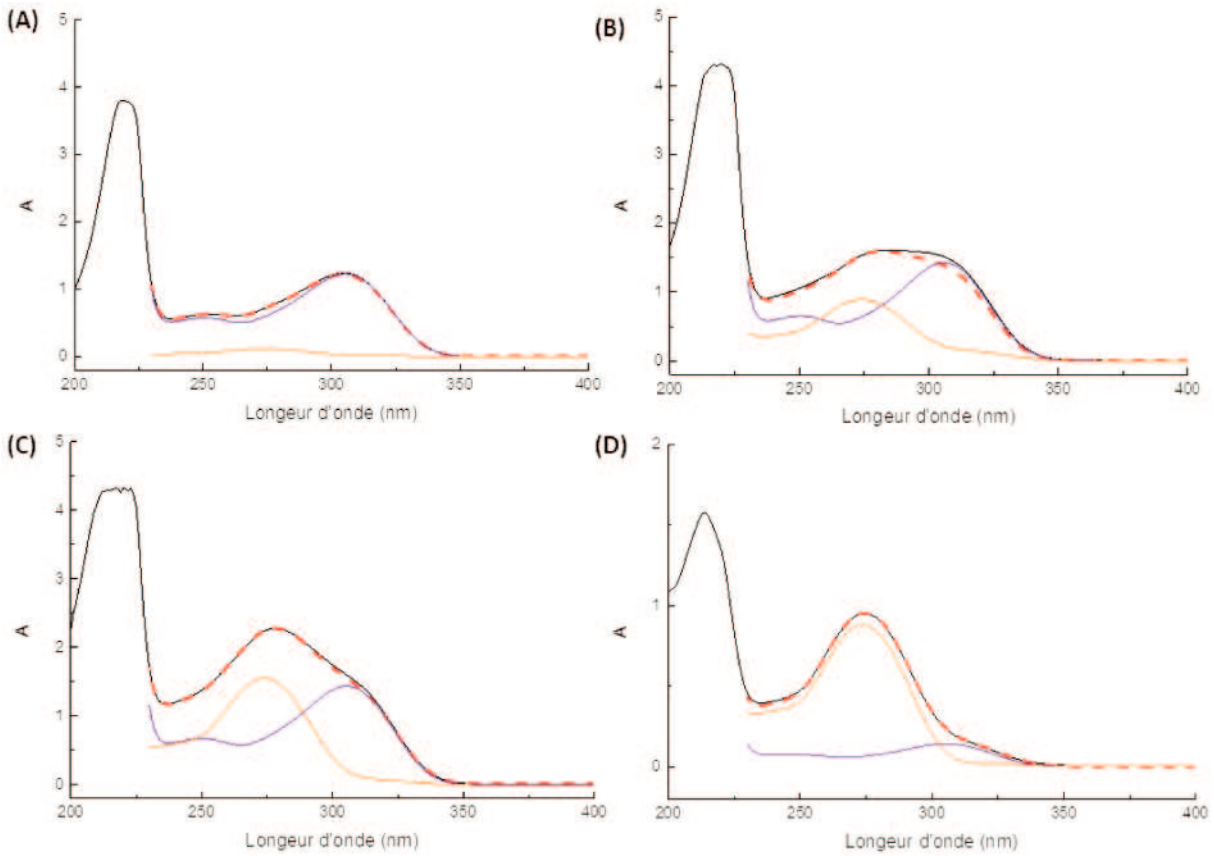


Figure 92 : Spectres UV du CPC-7G à (A) 1 h, (B) 1 j, (C) 9 j et (D) 110 j de libération avec le spectre expérimental (noir), la décompositon (rouge), le GaM (violet) et le maltol (orange)

Après décomposition des courbes obtenues, la libération obtenue du GaM par UV pour le CPC-7G est identique à celles du gallium obtenues par AAS. Pour le CPC-3,5G une différence de 3 % est notée à partir de 1 j et est constante jusqu'à la fin de l'étude. Cette différence s'explique par le fait que la concentration en GaM est inférieure à 20 ppm, et que le spectre UV présente des bandes provenant à la fois du GaM mais aussi du maltol, ce qui diminue la concentration calculée du complexe après décomposition.

La libération du maltol mesurée à 274 nm, quant à elle, est présentée sur la Figure 93 ci-après. Une libération lente et continue du maltol est observée pendant 116 j pour le CPC-3,5G et 166 j pour le CPC-7G. À la fin de la libération, 46 ± 1 et 36 ± 1 % de maltol ont été mesurés pour les CPC-3,5G et CPC-7G.

D'après les résultats obtenus en AAS, nous savons que les CPCs contiennent encore, respectivement pour le CPC-3,5G et CPC-7G environ 46 et 36 % de GaM, soit une quantité en maltol équivalente. La quantité de maltol libéré correspondant à la quantité en ligand restant

théorique dans les CPCs, il est possible d'en conclure que le maltol est totalement libéré, soit sous la forme du complexe soit seul et que le gallium se trouve sous une autre forme au sein du CPC.

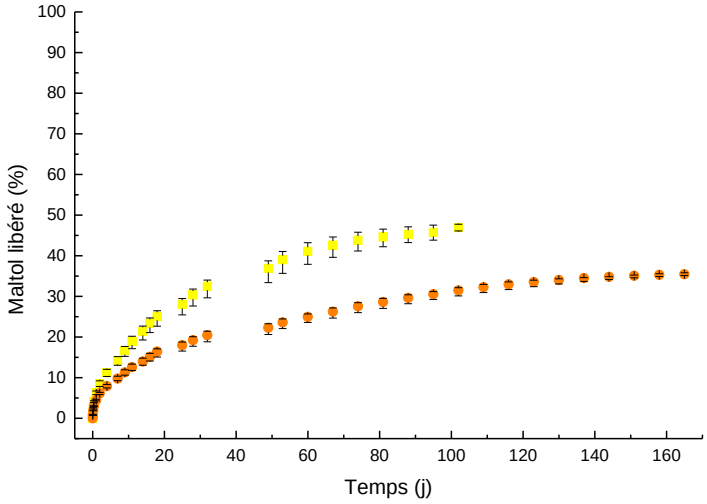


Figure 93 : Libération du maltol en fonction du temps du CPC-3,5G (jaune) et du CPC-7G (orange)

Une fois le maltol déligandé du gallium, nous avons voulu déterminer s'il était soumis à la diffusion de Fick. Ainsi, la libération a été étudiée selon le modèle d'Higuchi et celui de Korsmeyer-peppas (Tableau 26) à l'instar des libérations des CPCs chargés en anesthésiques locaux. Tout d'abord, les deux modèles sont adéquats pour décrire la libération du maltol pour les deux formulations de CPCs. À la vue des résultats obtenus, les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-peppas confirment que le mécanisme mis en jeu du maltol (ligand) est la diffusion de Fick.

Tableau 26 : Comparaison des profils de libération du maltol des CPC-3,5G et CPC-7G selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	**Équation**	**Paramètre**	**CPC-3,5G**	**CPC-7G**
Higuchi	$Q(\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9981	0,9950
		a	5,53	3,23
Korsmeyer-peppas	$Q(\%) = kt^n$	r^2	0,9919	0,9930
		k	5,71	4,14
		n	0,50	0,44

Pour résumer le GaM contenu dans les CPCs est libéré de moitié à l'aide d'une libération flash alors que le reste du gallium reste piégé au sein du biomatériau. En revanche, le maltol, lui, est libéré en totalité soit par le biais du complexe soit seul. Cette dernière observation permet d'en

déduire que le gallium se situe sous une autre forme. Il est probable que les ligands aient été remplacés par d'autres espèces ioniques présentes dans le CPC telles que les ions hydroxyles ou phosphates. À l'heure actuelle, la modification structurelle du gallium au sein du CPC reste non élucidée.

4.3. Visualisation de la libération par cartographie raman

Afin de visualiser la diffusion du principe actif au sein du CPC, une cartographie raman a été effectuée sur plusieurs échantillons selon le protocole décrit au chapitre II, page 75. La formulation du CPC-7G contenant deux fois plus de PA que celle du CPC-3,5G, elle a été choisie pour cette expérience. Ainsi, les échantillons (N = 6) ont été cartographiés à des temps différents de libération soit t = 0, 1, 6, 24, 72 et 192 h. Le pourcentage de GaM libéré est calculé à partir de la mesure AAS et comparé à la courbe de libération de référence de notre formulation.

Les bandes utilisées pour analyser le GaM (Figure 94 A) et le maltol (Figure 94 B) se situent à 729 cm^{-1} et 703 cm^{-1} respectivement. Les mesures ont été réalisées selon plusieurs types de seuillage (i) le premier entre 0 et 100000, permet d'observer la répartition du principe actif sur la surface du ciment analysée (ii) le second entre 60000 et 61000, permet d'observer les points chauds c'est-à-dire la localisation où les molécules sont les plus concentrées.

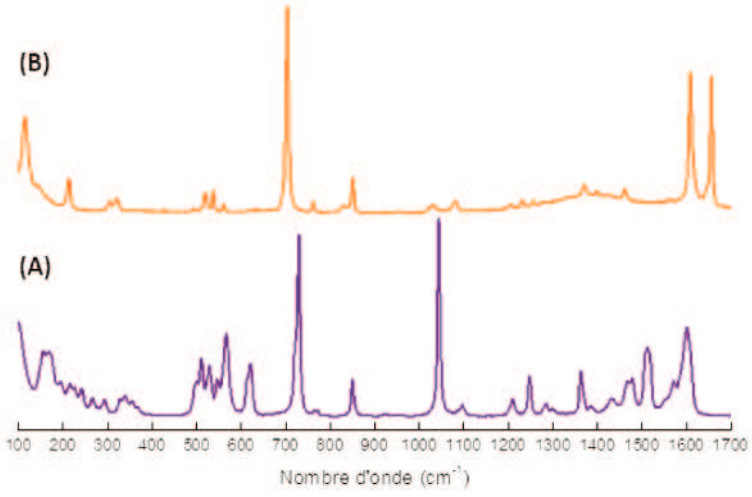


Figure 94 : Spectres raman (A) du GaM et (B) du maltol

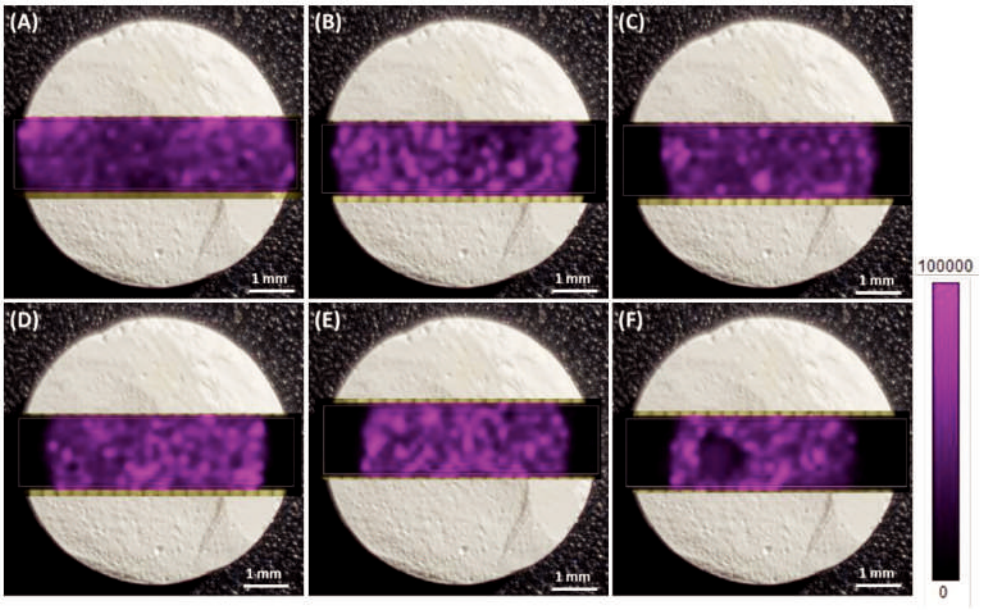


Figure 95 : Répartition du GaM par cartographie raman du CPC-7G après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 72 h, et (F) 192 h de libération à 37 °C dans une solution saline

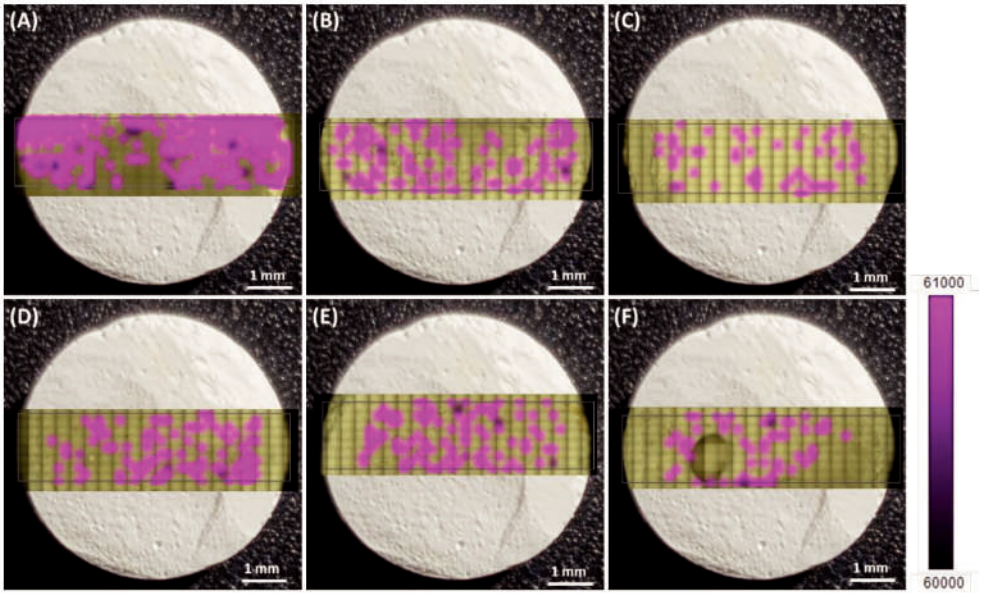


Figure 96 : Répartition des points chauds du GaM par cartographie raman du CPC-7G après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 72 h, et (F) 192 h de libération à 37 °C dans une solution saline

On peut ainsi observer la répartition du GaM sur la Figure 95 en fonction du temps de libération. La Figure 95 A, montre une répartition homogène de la molécule active avant la libération (t = 0 h). Ensuite, au fur et à mesure de la libération, les bords des cylindres perdent totalement l'intensité vis-à-vis de la bande ramant représentative du GaM. Un fort contraste est observé entre la surface contenant encore du GaM et celle n'en contenant plus. Le processus de libération s'effectue de la partie externe vers le centre de l'échantillon comme observé pour les ciments chargés en bupivacaïne. Néanmoins, la libération de l'échantillon à 6 h a montré une libération plus importante que les autres échantillons ce qui est observable sur la cartographie raman, l'échantillon ne sera donc pas pris en compte pour la suite de l'étude.

La Figure 96 permet de localiser les endroits où le GaM se trouve en forte concentration à partir de la répartition des points chauds de ce dernier. La taille des grains de GaM étant de quelques µm et la répartition étant homogène, il est possible d'observer de nombreux points chauds pour chaque cartographie. Cependant, la focalisation pour l'échantillon à t = 0 h a été affectée par la coupe du cylindre (surface non plane) mais l'homogénéité du PA reste observable. Il est également possible de remarquer, que les grains situés sur les bords du cylindre sont totalement dissous par l'effet de la lixiviation du biomatériau par la solution saline et le même processus que précédemment est observé. Cette dernière représentation sera utilisée pour les calculs de surface présentés ci-dessous.

Il est à noter que pour les deux représentations (Figure 95 et 95), la bande représentative du maltol, mesurée à 703 nm, n'a été observée.

Une corrélation entre la surface contenant du principe actif et la quantité de ce même PA restant dans le biomatériau a également été réalisée. La Figure 97 représente la simulation de la surface contenant du principe actif (en violet) dont les cercles ont été tracés à partir de la cartographie avec le seuillage de 60000 à 61000 (points chauds) et la courbe de corrélation entre la surface et la quantité de GaM. Cette dernière a été calculée à partir de la quantité de gallium libéré et mesurée par spectroscopie AAS. Ainsi, les pourcentages de la surface contenant encore du principe actif sont semblables avec les pourcentages de PA restants jusqu'à 72 h. Cette observation indique que, dans les premières heures de libération, la diffusion du PA est homogène. À 192 h, la surface contenant du PA est plus petite par rapport à la valeur théorique c'est-à-dire qu'il reste 54 □ comparé à 59 □ théorique. À ce stade, 8 % de maltol a été dosé dans la solution de libération, il y a donc au sein du CPC du gallium qui possède 0, 1 ou 2

ligands de maltol, ce qui signifie que le signal de GaM pour ces molécules est modifié voir éteint. Cette hypothèse pourrait justifier de la différence observable à ce temps de libération.

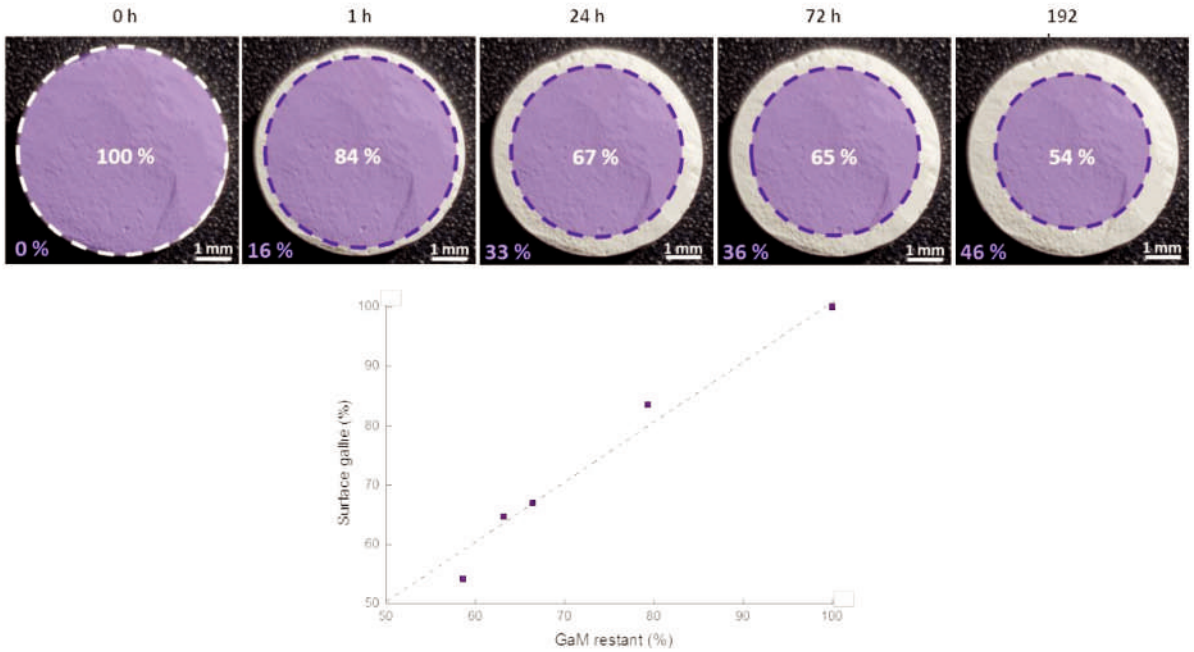


Figure 97 : Corrélation entre la surface contenant du principe actif et la quantité du PA restant dans le CPC

Pour conclure, la cartographie raman a permis de visualiser la diffusion du complexe de gallium au sein du ciment. Cette diffusion homogène du principe actif, à l'image du CPC chargé en anesthésique local, s'effectue de la partie externe du cylindre vers le centre de ce dernier.

6. Premières études in vitro

Le gallium étant réputé pour ces propriétés antibactériennes contre de nombreuses souches, nous avons voulu observer si nos CPCs galliés possédaient une activité antibactérienne et particulièrement sur les souches S. aureus et S. epidermidis. Dans la littérature,[310] il a été démontré que le GaM avait des propriétés à la fois inhibitrices et bactéricides contre ces souches de bactéries. Les résultats des CMI ont montré une inhibition de la croissance du S. aureus à partir de 2 $mg.mL^{-1}$ pour une solution à 10^4 $bactéries.mL^{-1}$ et du S. epidermidis à partir de 0,1 $mg.mL^{-1}$ pour une solution à 10^5 $bactéries.mL^{-1}$. De plus, ce PA a présenté une activité bactéricide sur le S. aureus et le S. epidermidis à partir de 6 $mg.mL^{-1}$ pour des concentrations en bactéries de 10^4 $bactéries.mL^{-1}$ et 10^5 $bactéries.mL^{-1}$ respectivement.

Cette partie a pour but d'étudier l'activité antibactérienne des CPCs galliés vis-à-vis de la flore bactérienne observable lors d'une chirurgie osseuse. La libération de maltolate de gallium du CPC-7G étant plus importante, seul le GaM issu de ce CPC sera analysé lors de cette étude préliminaire.

6.1. Protocole expérimental

L'activité antibactérienne du CPC-7G est évaluée à l'aide des mêmes souches de références présentées dans le chapitre II soit une souche ATCC® 29213^{TM} pour le staphylococcus aureus et une souche ATCC® 12128^{TM} pour le staphylococcus épidermidis.

6.1.1. Concentration minimale inhibitrice et bactéricide

L'activité antimicrobienne du GaM incorporé a été mesurée grâce à la détermination des CMI et CMB selon le protocole décrit au chapitre II partie B (page 132). La gamme de dilution a été réalisée à partir d'une solution mère de GaM à 10 mg.mL^{-1} dans un bouillon de Mueller-Hinton (MH). Tous les essais ont été réalisés en duplicata pour chaque concentration de GaM.

6.1.2. Essai sur la libération du GaM

La libération a été effectuée à partir de pastilles de CPC-7G, préparées selon le protocole décrit Chapitre II page 72. Une fois réalisées, ces dernières sont immergées dans 1 mL d'une solution de NaCl à 0,9 %, puis placées dans une étuve à 37 °C installée sur un agitateur orbitalaire (90 tr/min). Aucun renouvellement de la solution n'est effectué afin d'obtenir une concentration, vérifiée par spectroscopie UV-visible, adéquate en GaM.
Les expériences avec les souches S. aureus et S. epidermidis ont été effectuées selon le protocole également décrit Chapitre II page 132.

6.2. Résultats

6.2.1. Détermination des CMI et CMB

Les CMI et CMB déterminées pour les différentes souches sont présentées dans les Tableau 27 et 28 ci-après. Le GaM présente une activité inhibitrice et bactéricide seulement à 5 mg.mL^{-1} pour une quantité allant de 10^2 à 10^5 bactéries.mL^{-1}. À 10^6, seule une activité inhibitrice est observée sur la souche S. aureus.

Tableau 27 : Résultats des CMI et des CMB du GaM en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. aureus

Bactérie	CMI ($mg.mL^{-1}$)	CMB ($mg.mL^{-1}$)
10^2	5	5
10^3	5	5
10^4	5	5
10^5	5	5
10^6	5	/

Pour la souche S. epidermidis, le GaM a une activité inhibitrice à 5 $mg.mL^{-1}$ sur la totalité des solutions soit 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 bactéries.mL^{-1}. L'effet bactéricide a été observé seulement sur les concentrations à 10^2 et 10^3 bactéries.mL^{-1}.

Tableau 28 : Résultats des CMI et des CMB du GaM en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. epidermidis

Bactérie	CMI ($mg.mL^{-1}$)	CMB ($mg.mL^{-1}$)
10^2	5	5
10^3	5	5
10^4	5	/
10^5	5	/
10^6	5	/

6.2.2. Étude des activités inhibitrice et bactéricide d'un CPC-7G

Les études préliminaires sur la libération du GaM montrent une activité inhibitrice du composé sur la souche S. epidermidis aux concentrations 10^2, 10^3 et 10^4 bactéries.mL^{-1}, pour une solution en GaM à 6 $mg.mL^{-1}$. Aucune activité inhibitrice n'a été observée sur le S. aureus et aucune activité bactéricide n'a été distinguée sur les deux souches. Par conséquent, il est probable que le GaM une fois libéré ait perdu de son activité bactérienne.

7. Conclusions et Perspectives

L'association du complexe de GaM et d'un CPC n'engendre pas de grandes modifications des propriétés usuelles du ciment commercial, puisque seules les propriétés rhéologiques et mécaniques sont affectées mais ceci sans entacher l'utilisation future du CPC. Les études de libérations ont montré que ces systèmes combinés permettent d'obtenir une libération flash du composé dans les premières heures. La suite de l'analyse nous a montré que le GaM perdait ces ligands maltol, dont la diffusion est modélisable par les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas. Cette libération relève alors la création d'une compétition entre le ligand maltol et les composés du ciment vis-à-vis du gallium. À l'heure actuelle, la nature chimique du gallium post-libération reste encore inconnue. Des études sont en cours afin de déterminer cette dernière. Pour finir, Les premières études in vitro du GaM pur montrent une activité cohérente des activités inhibitrices et bactéricides de ce composé vis-à-vis des souches S. aureus et S. epidermidis. Cependant, lorsque le GaM est libéré par le CPC, ce dernier perd en activité et seule une activité inhibitrice est observée sur le S. epidermidis. Des études sont également en cours dans le but de comprendre les différences observées.

Partie B *: Essai d'une formulation d'un* ciment PCa chargé en caséine

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation de polymères biodégradables dans les biomatériaux a fortement augmenté. Leur intégration permet de moduler les propriétés rhéologiques ou de vectoriser des principes actifs dans le cadre de systèmes de libération contrôlée.[341] Dans ce cadre, les protéines alimentaires sont très prometteuses en raison de leurs excellentes propriétés fonctionnelles comprenant leurs propriétés émulsifiantes, moussantes, de gélifications, et d'hydratation, et en tant que vecteurs pour la libération de molécules actives.[342,343] En effet, elles ont la capacité d'interagir avec un large spectre de PA via leurs groupements fonctionnels (comme les groupements phosphates), permettant ainsi une variété de possibilités de liaison avec les PA et de les protéger jusqu'à leur libération in situ.[344] Il existe une grande variété de formulations de système de libération de PA à base de protéines décrits dans la littérature comprenant notamment les films,[345,346] les hydrogels,[347,348] les microparticules[349–351] et les nanoparticules.[352] Ces systèmes sont formulés à base de gélatine, de collagène, d'albumine, de protéine de lactosérum et de caséine. Cette dernière, principale protéine du lait, est peu coûteuse, facilement disponible, biocompatible et biodégradable.

Les caséines représentent environ 80 % des protéines contenues dans le lait de vache.[353] Il existe quatre types de molécules de caséines (α_{S1}-, α_{S2}-, β- et κ-caséines) dont le poids moléculaire, la composition en acides aminés, leur concentration dans le lait de vache ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont relativement bien connus (Tableau 29).[354] Ces molécules sont constituées d'acides aminés dont les principaux sont la proline, la leucine, l'acide glutamique, l'acide aspartique et la sérine. Ce dernier peut se trouver sous sa forme phosphorylée conférant ainsi aux caséines une bonne capacité à créer des liaisons avec des phosphates de calcium.

Tableau 29 : Propriétés caractéristiques des caséines α_{S1}, α_{S2}, β et κ[354,355]

Caséine	**α_{s1}**	**α_{s2}**	**β**	**κ**
Mw (Da)	23 614	25 230	23 983	19 023
Concentration ($g.L^{-1}$)	10	2,6	9,3	3,3
Acide aminé	199	207	209	169
Phosphosérine	8	11	5	1
Glycosylé	0	0	0	0 - 5
Charge à pH 6,6	- 21	- 15	- 12	- 3

Dans le lait, les caséines sont majoritairement présentes sous forme de micelles. Ces dernières coexistent en équilibre avec des molécules de caséine libre. De nos jours, la structure exacte de ces micelles n'est toujours pas élucidée bien que plusieurs modèles aient été présentés.[356]

Les caséinates de sodium sont obtenus par précipitation des caséines en milieu acide, puis par neutralisation de ces dernières grâce à l'ajout d'une base telle que NaOH. Ces particules feront l'objet de l'étude avec les CPCs et le protocole sera détaillé plus précisément dans la partie suivante. Lorsque ce composé est présent à faible concentration, c'est-à-dire inférieur à 10 g/L, la solution est transparente, en revanche, lorsque la concentration augmente, cette dernière devient opaque. Cette caractéristique est induite par la présence de grandes particules, qui sont difficiles voire impossible à enlever complètement par centrifugation et filtration.[357] Pour une concentration inférieure à 100 g/L, la viscosité de ces protéines est faible. En théorie, la gélification acide des caséinates de sodium à lieu pour des pH allant de 4,7 - 5,2. Cependant la présence de sel, comme du NaCl, modifie la force ionique et limite le gel formé voire inhibe sa formation en forte concentration.[358] Pour finir, l'addition de calcium peut engendrer l'agrégation de ces molécules.[359]

Les propriétés structurelles et physico-chimiques des caséines justifient leur utilisation dans les systèmes de libération de principe actif. Par exemple, la capacité de gonflement du gel de caséine sensible au pH permet alors d'établir une libération dite « contrôlée ».[360] De plus, l'aptitude de protection de la caséine permet le contrôle de l'accessibilité du PA ainsi que la promotion de sa disponibilité. Par exemple, les propriétés d'absorbance UV entre 200 et 300 nm de la caséine ont la possibilité de protéger le PA contre les rayonnements UV dans cette gamme.[352,361] D'autre part, l'aptitude de cette protéine à interagir avec d'autres molécules permet la formation de complexes dont les propriétés s'additionnent de façon synergique. Par conséquent, la caséine se révèle être un bon candidat dans la formulation de systèmes permettant la délivrance in situ de principes actifs.

Le but de cette partie est d'étudier la libération du GaM dans un système combiné dans lequel la caséine a été intégrée. Cependant, pour ce faire, il est utile en premier lieu d'étudier les potentielles variations rhéologiques et structurelles introduites par l'association de la caséine au sein d'un biomatériau.

1. Obtention de la caséine

Le caséinate de sodium utilisé pour cette étude a été fourni par l'INRA de Rennes, service Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO). Cette dernière a été obtenue à partir de 5 L de lait entier. Ce dernier est constitué par une suspension colloïdale de protéines (micelles de caséine de 200 nm), d'albumine et de lipides contenus dans une solution aqueuse constituée de lactose, de vitamine (riboflavine) et de sels minéraux. La première étape du processus consiste à écrémer le lait afin d'enlever la matière lipidique du milieu. Le pH du lait est de base légèrement acide (pH = 6,6), pour récupérer la caséine, il est nécessaire de la faire précipiter. La méthode consiste alors à abaisser le pH à l'aide d'une solution de HCl à 1 $mol.L^{-1}$ jusqu'à dépasser le point isoélectrique de la caséine (pHi = 4,6). Le précipité est ensuite réparti dans 5 flacons afin de procéder aux cycles de lavage à l'aide d'eau Ultra Pure (UP) et placés dans une centrifugeuse pendant 30 min, à 20 °C avec une vitesse de 1500 tr/min, cette action est répétée au minimum 3 fois. La caséine obtenue est ensuite solubilisée dans une solution aqueuse de NaOH à 1 $mol.L^{-1}$ permettant de remonter le pH à 7. La poudre de caséinate de sodium est ensuite obtenue par lyophilisation avec une masse finale d'environ 100 g.

2. Formulation du ciment

Les formulations de ciment étudiées dans cette partie ont été obtenues grâce à l'utilisation de deux ciments apatitiques commerciaux (le QuickSet et le GEN de Graftys SA). La caséine est recouverte d'azote liquide puis broyée dans un mortier afin d'obtenir une fine poudre. Elle est ensuite ajoutée à la phase solide du ciment. Les concentrations seront définies à partir des expériences suivantes. Les mélanges sont, par la suite, homogénéisés à l'aide d'un agitateur tridimensionnel pendant 1 h à une vitesse de 50 tr/min. Une fois cette étape réalisée, la pâte de ciment est préparée en gâchant la poudre avec une solution de Na_2HPO_4 à 5 % avec un rapport L/P = 0,5 pour le ciment GEN et une solution de Na_2HPO_4 à 0,5 % pour le ciment QuickSet avec un rapport L/P = 0,45.

2.1. Validation d'un modèle de ciment combiné en caséine sans HPMC

La caséine pouvant interagir avec l'HPMC, l'association de cette protéine avec un ciment a été étudiée avec un CPC ne contenant pas de polymère. Cependant, l'HPMC étant inclus dans le processus d'industrialisation de la poudre du QuickSet, cette combinaison a été testée au préalable avec un ciment commercial sans HPMC (GEN), composé également à 78 □ d'α-TCP.

Les CPCs sont référencés selon les dénominations suivantes :

- GEN-1C pour la formulation d'un ciment combiné avec 1 % de caséine,
- GEN-2C pour la formulation d'un ciment combiné avec 2 % de caséine.
- GEN-3C pour la formulation d'un ciment combiné avec 3 % de caséine.
- GEN-6C pour la formulation d'un ciment combiné avec 6 % de caséine.

La phase dans laquelle la caséine a été ajoutée est spécifiée par un (L) pour la phase liquide et (P) pour la phase solide.

2.1.1. Influence de la caséine sur la structure du biomatériau

L'ajout de molécules peut engendrer des modifications autant sur les propriétés structurales que texturales des CPCs. La Figure 98 présente les courbes de déformation en fonction de la contrainte pour (A) un matériau fragile et (B) un matériau ductile. Un matériau fragile (Figure 98 A) est caractérisé par une rupture typique définie par une perte totale de la résistance au moment du point de rupture. En amont, la déformation est dite élastique et la rupture au sommet de la courbe est nette. De ce fait, les valeurs obtenues par les mesures de la résistance à la compression sont très discriminantes d'un matériau à un autre. En revanche, pour les matériaux ductiles (Figure 98 B), ces derniers sont caractérisés par une déformation élastique, suivie d'une déformation plastique. La rupture n'est alors plus nette mais ressemble plutôt à un affaissement du matériau.

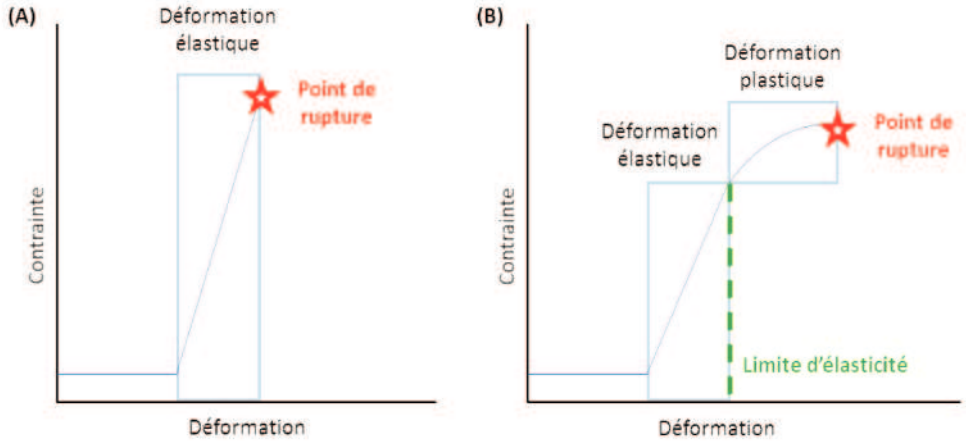


Figure 98 : *Représentation schématique des courbes de contrainte d'un matériau (A) fragile et (B)* ductile

Ainsi, le but de vérifier si l'association de la caséine à un impact sur les propriétés mécaniques du GEN des mesures de la résistance à la compression ont été effectuées. Lors de ces expériences, la caséine a été ajoutée à 3 et 6 % soit (i) dans la phase liquide du durcisseur soit

(ii) dans la phase solide du ciment. La résistance à la compression a été, ensuite, mesurée après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline. Tout d'abord, pour les ciments formulés à partir de la caséine dans le durcisseur (Figure 99), cette association entraîne une diminution significative de la résistance à la compression de 13,4 ± 2,5 MPa pour le GEN à 11,0 ± 0,5 MPa et 5,6 ± 2,2 MPa pour le GEN-3C(L) et le GEN-6C(L) respectivement. De plus, l'allure des courbes tend à être modifiée en fonction de la concentration de caséine ajoutée au liquide durcisseur. Pour chaque matériau la rupture est nette, cependant après cette rupture le matériau se déforme à l'image des matériaux ductiles (courbe du GEN-6C(L)).

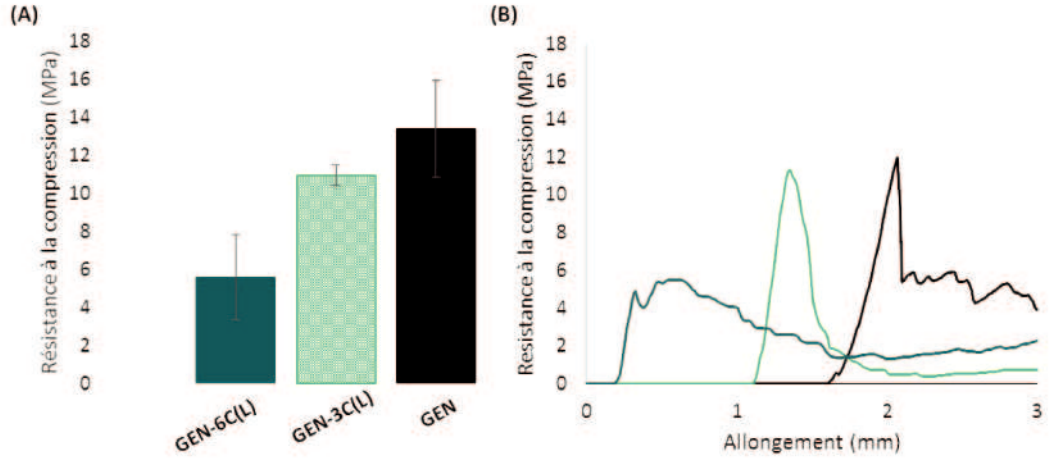


Figure 99 : (A) Résistance à la compression et (B) courbes des ciments : GEN (noir), GEN-3C(L) (turquoise clair) et GEN-6C(L) (turquoise foncé) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C

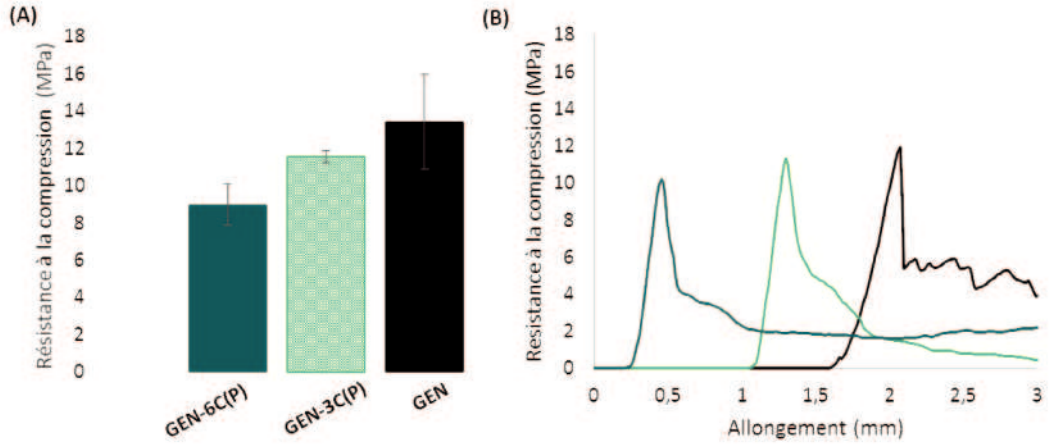


Figure 100 : (A) Résistance à la compression et (B) courbes des ciments : GEN (noir), GEN-3C(P) (turquoise clair) et GEN-6C(P) (turquoise foncé) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C

Pour les ciments formulés à partir de la caséine dans la phase solide (Figure 100), cette association entraîne une diminution de la résistance à la compression allant de 13,4 ± 2,5 MPa

pour le GEN à 11,56 ± 0,3 MPa et 8,98 ± 1,1 MPa pour le GEN-3C(P) et le GEN-6C(P) respectivement. Concernant l'allure des courbes, la rupture est nette et typique d'un matériau fragile pour toutes les formulations. La caséine n'impacte donc pas les propriétés mécaniques dans cette méthode d'association.

Des ciments chargés avec 9 et 12 % en caséine (dans la phase liquide et solide) ont également été testés mais les cylindres n'étaient pas suffisamment cohésifs et se délitaient une fois immergés dans la solution de NaCl.

La microstructure des matériaux obtenus a été visualisée par analyse MEB. D'après la Figure 101, quelle que soit la concentration de caséine intégrée dans le ciment (soit dans la phase liquide ou soit dans la phase solide), la microstructure du CPC reste inchangée.

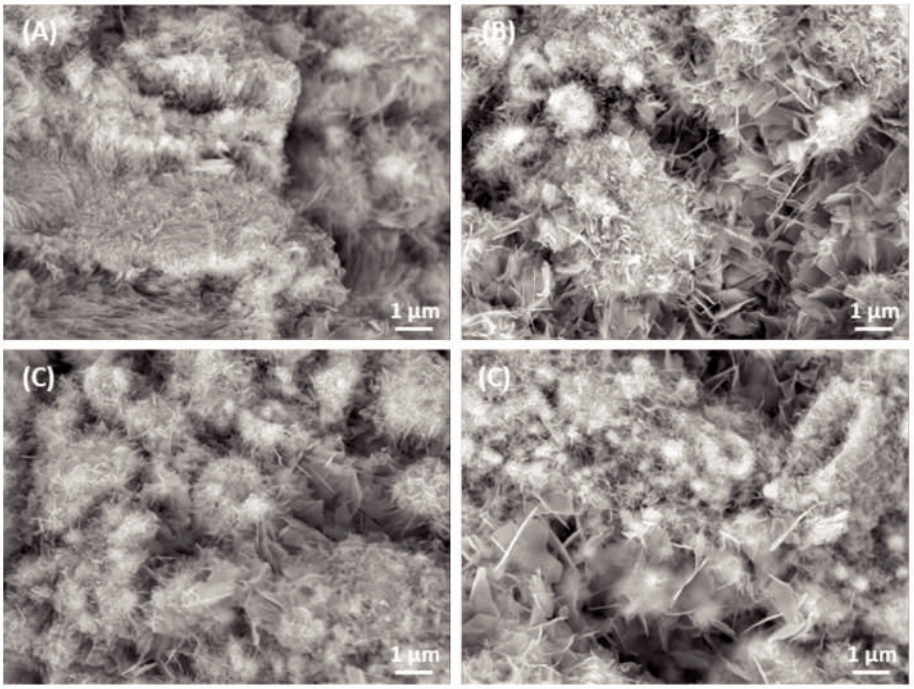


Figure 101 : Photographies MEB à fort grandissement du GEN (A), du GEN-3C(L) (B), du GEN-6C(L) (C) et GEN-12C(L) (D) dans la phase liquide après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline

2.1.2. Influence sur les propriétés texturales du biomatériau

La travaillabilité du ciment GEN en présence de 1 et 2 % de caséine dans la phase solide a été étudiée à 3, 5 et 8 min (Figure 102). Tout d'abord, l'injectabilité du GEN n'est pas modifiée entre 3 et 8 min et prend les valeurs de 4,9 ± 0,8 ; 5,2 ± 0,2 et 5,9 ± 0,7 N pour les temps 3, 5 et 8 min. Cependant, seulement 77 ± 0,4 % de la pâte de ciment a été extrudée pour chaque temps, révélant un phénomène de séparation de phase. L'ajout de la caséine à 1 % sans

modification du liquide durcisseur engendre une diminution de l'injectabilité (9,8 ± 1,4 ; 12,5 ± 1,6 et 20,1 ± 1,3 N pour les temps 3, 5 et 8 min) ainsi qu'une augmentation du phénomène de démixtion observable par la diminution du pourcentage de pâte extrudée. Il est décrit dans la littérature que la caséine en présence de calcium forme des petits agrégats[359] dont le rayon est d'environ 11 nm.[357] Les propriétés rhéologiques d'un ciment sont sensibles à la modification de la taille des composants ainsi, la formation d'agrégats serait la cause de la diminution de l'injectabilité et de l'augmentation du phénomène de démixtion. Lors de l'ajout de 2 % de caséine dans la phase solide du biomatériau, l'injectabilité augmente par rapport au GEN-1C(P) à 3 min provenant de l'augmentation de la viscosité du mélange grâce à l'augmentation de la concentration en protéines. Néanmoins, à partir de 5 min, l'injectabilité de la pâte tend à devenir semblable à celle du GEN-1C(P). Dans la littérature,[359] il est écrit que la formation des agrégats n'est pas spécifique à la concentration de la caséine ce qui expliquerait cette similitude au niveau de l'injectabilité à partir de 5 min. Il est observé également une diminution du phénomène de démixtion provenant de la faible augmentation de la viscosité de la pâte.

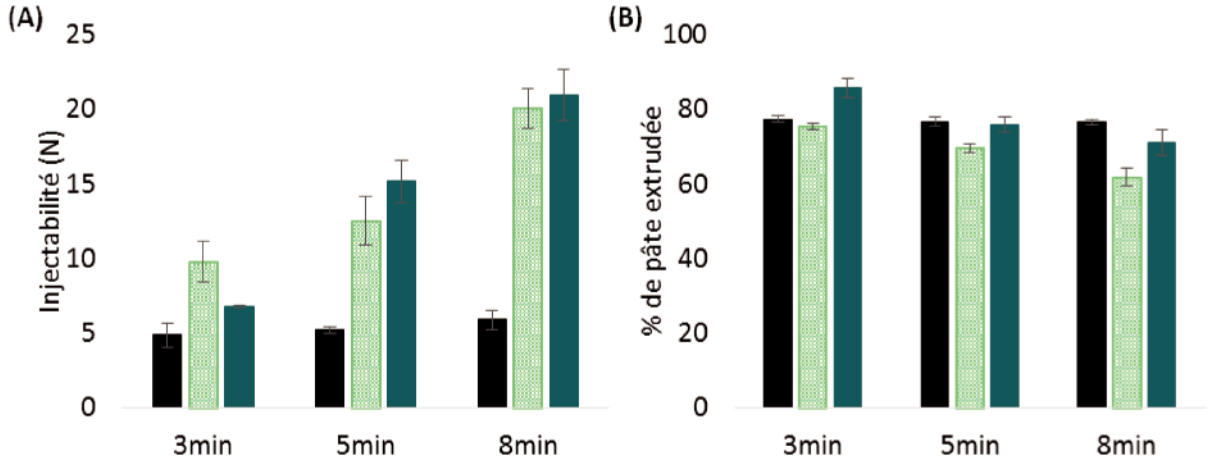


Figure 102 : (A) Injectabilité et (B) % de pâte de ciment extrudée du GEN (noir), du GEN-1C(P) (turquoise clair) et du GEN-2C(P) (turquoise foncé) à 3, 5 et 8 min

En conclusion, l'association de la caséine n'impacte pas les propriétés structurales du ciment lorsqu'elle est intégrée sous forme solide alors que sous forme liquide, après une rupture fragile, le matériau possède des propriétés plus élastiques. Concernant l'injectabilité, la caséine altère cette propriété via la formation d'agrégats. Pour résumer, il est possible de formuler un ciment avec de la caséine mais son injectibilité nécessite d'être augmentée via l'ajout d'un rhéofluidifiant. Dans la suite de l'étude, l'ajout de la caséine sera étudié avec un CPC contenant de l'HPMC, le QuickSet.

2.2. Étude de l'impact de la caséine sur un CPC contenant de l'HPMC

La faisabilité de formuler un ciment apatitique contenant de la caséine étant démontrée, nous avons réalisé des expériences similaires avec notre ciment commercial de référence (QuickSet, Graftys SA). La caséine est directement ajoutée sous forme de poudre à la phase solide du ciment à 1 et 2 % en masse. Les mélanges sont, par la suite, homogénéisés à l'aide d'un agitateur tridimensionnel pendant 1 h à une vitesse de 50 tr/min. Ensuite, la pâte de ciment est préparée en gâchant la poudre avec une solution de Na_2HPO_4 à 0,5 % avec un rapport L/P = 0,45.
Les CPCs sont référencés selon les dénominations suivantes :

- CPC-1C pour la formulation d'un ciment combiné avec 1 % de caséine,
- CPC-2C pour la formulation d'un ciment combiné avec 2 % de caséine.

Lorsque la modification de la concentration en Na_2HPO_4 du liquide durcisseur a été nécessaire, celle-ci est spécifiée par un chiffre entre parenthèses correspondant à la concentration en pourcentage Na_2HPO_4 (ex : CPC(2) pour une formulation d'un CPC avec Na_2HPO_4 à 2 %).

2.2.1. Influence sur la réaction de prise et le produit final

Dans la logique de contrôler la nature du produit final obtenu, les formulations de ciments associés à de la caséine ont été étudiées par pDRX, IRTF et RMN ^{31}P du solide selon les protocoles expérimentaux décrits dans le chapitre II. Les formulations des ciments combinés étudiées dans cette partie sont les suivantes (Tableau 30).

Tableau 30 : Résumé des différentes formulations utilisées

Nom	**CPC**	**CPC-1C**	**CPC(2)**	**CPC-2C(2)**	**CPC(5)**	**CPC-2C(5)**
Ciment	GQS	GQS	GQS	GQS	GQS	GQS
PA (%)	/	Caséine (1 % w:w)	/	Caséine (2 % w:w)	/	Caséine (2 % w:w)
Na_2HPO_4 (%)	0,5	0,5	2	2	5	5
L/P	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45

Chaque diffractogramme obtenu entre les formulations de ciment chargé en caséine et leur contrôle (Figure 103) sont semblables. Les raies représentatives de la CDA, de l'α-TCP et du DCPA sont observables sur la totalité des analyses. De plus, l'avancement des différentes formulations ne semble pas être modifié par l'association de la caséine. Cependant, la modification en concentration du liquide durcisseur tend à modifier l'intensité respective des raies de CDA et α-TCP.

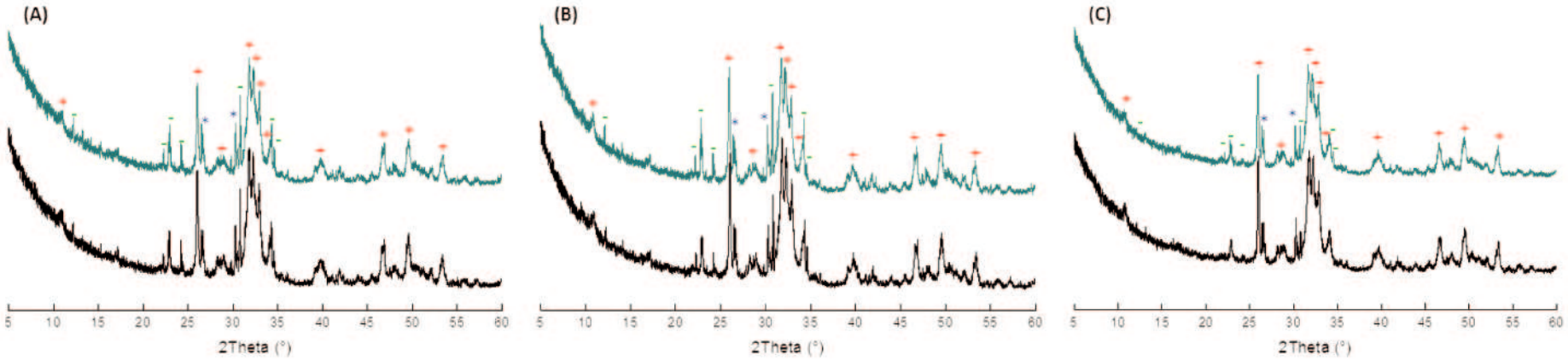


Figure 103: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en caséine) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir) et le CPC chargé en caséine (turquoise) avec (A) CPC-1C, (B) CPC-2C(2) et (C) CPC-2C(5), + *pic de l'apatite*, - *pic de l'α*-TCP et * pic de la monétite

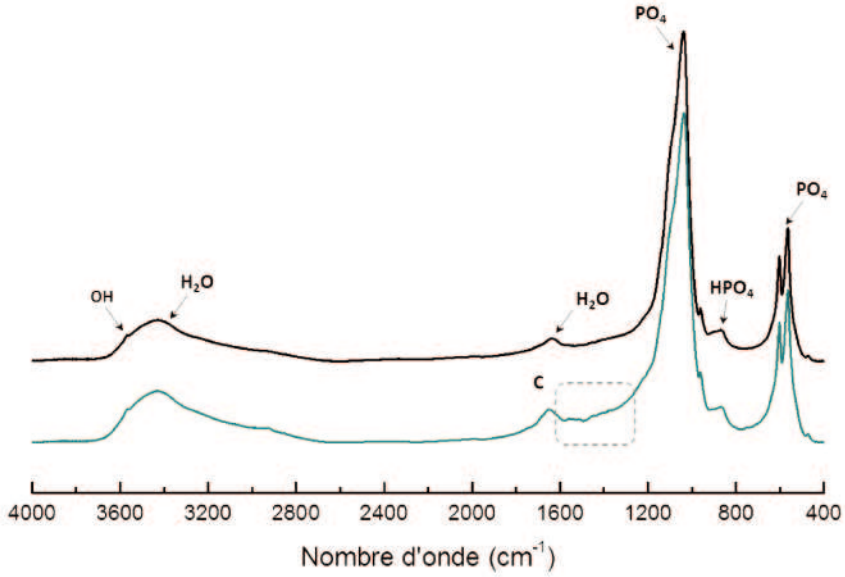


Figure 104 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en caséine) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC(2) (noir), le CPC-2C(2) (turquoise) et - - - zone de visualisation de la caséine C

En effet, comme observé précédemment, l'augmentation de la concentration en Na_2HPO_4 dans le liquide durcisseur, permet une cinétique de prise du biomatériau plus rapide. L'écart observé entre les pics d'α-TCP et de CDA sera donc plus important dans le diffractogramme du CPC(5) par rapport au CPC.

L'analyse IRTF confirme également la présence de CDA après la prise du ciment pour le ciment contrôle et les ciments chargés en caséine (1 et 2 %). Les spectres étant tous similaires, seul celui du CPC-2C(2) et son contrôle sont présentés sur la Figure 104. Il est possible d'observer alors les bandes représentatives de l'eau entre 3500 - 3000 cm^{-1} et 1700 - 1600 cm^{-1}, celles représentant les vibrations des groupements PO_4^{3-} sont situées entre 1200 - 950 cm^{-1} et 650 - 500 cm^{-1}, celles des vibrations des groupements HPO_4^{2-} de l'apatite entre 900 - 800 cm^{-1} et pour finir, la bande du groupement hydroxyle de l'hydroxyapatite à 3570 cm^{-1}. Quelques bandes représentatives de la caséine sont observables sur le spectre du CPC-2C(2) entre 1600 - 1300 cm^{-1}. Néanmoins, la faible résolution de ces bandes ne permet pas d'être certain de l'intégrité de la caséine après son incorporation dans le ciment.

L'analyse par RMN ^{31}P à l'état solide (Figure 105) met en évidence la présence de CDA (composé d'un pic à 3,1 ppm) et de DCPA (composé de 2 pics à -0,2 et -1,5 ppm) quelle que soit la formulation de ciment. Leur déconvolution indique la proportion en CDA au sein des biomatériaux combinés ainsi que pour leur contrôle respectif (CPC sans caséine). Les pourcentages de CDA obtenus sont les suivants (i) 66 % pour le CPC-1C ainsi que pour le CPC contrôle (ii) 67 % pour le CPC-2C(2) avec une valeur similaire pour le contrôle et (iii) 75 % pour le CPC-2C(5) et son contrôle.

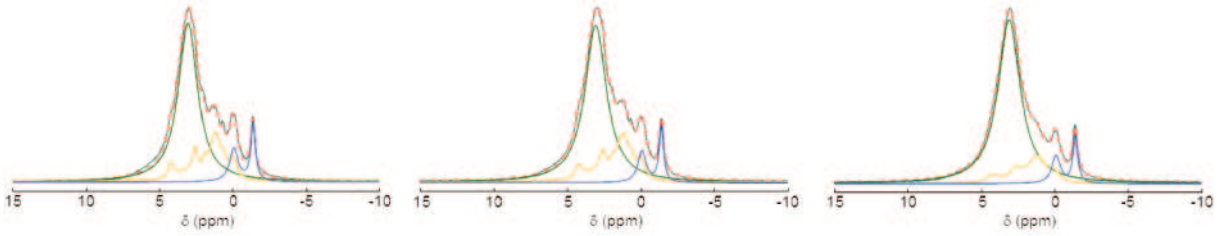


Figure 105 : Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC combiné (turquoise) avec (A) CPC-1C, (B) CPC-2C(2) et (C) CPC-2C(5), la déconvolution (rouge), la CDA (vert), *l'*α-TCP (jaune) et le DCPA (bleu)

Pour conclure, l'association de la caséine dans la phase solide d'un CPC contenant de l'HPMC ne nuit pas à la prise du CPC ainsi qu'au taux d'avancement de cette réaction. En revanche, la modification de la concentration en Na_2HPO_4 change la quantité de CDA formée avec une augmentation de celle-ci lorsqu'une concentration plus grande en Na_2HPO_4 est utilisée.

2.2.2. Influence sur les propriétés texturales du CPC

Le temps de prise des CPCs chargés en caséine a été étudié par la méthode des aiguilles de Gillmore. Lors de l'ajout du liquide durcisseur, le même phénomène que précédemment est observé, à savoir une pâte difficile à mélanger pendant les 30 premières secondes du mélange avant de devenir plus liquide. Cette dernière après mélange à un aspect plus collant et cohésif que le ciment contrôle (Figure 107).

Le CPC prend en 4 - 4,5 min alors que le CPC-1C possède un t_i plus long de 5,5 - 6,5 min, de plus lors de l'ajout de 2 □ de caséine, la pâte de ciment devient extrêmement liquide (Tableau 31). Pendant la prise de ce dernier, la surface se creuse en son centre et sèche, ce qui rend impossible la mesure du temps de prise initial du ciment. Par conséquent, sans modifier le rapport L/P et dans le but d'obtenir un temps de prise similaire au t_i du CPC, le pourcentage en Na_2HPO_4 de la solution de durcisseur a été augmenté à 2 et 5 %. Cet ajout d'ions calcium et phosphate dissous dans la phase liquide engendre une sursaturation plus rapide qui permet d'obtenir une précipitation de la CDA plus rapidement. En d'autres termes, plus la concentration en ions est élevée et plus le temps de prise est court.[219] Ainsi, les t_i diminuent en fonction de la concentration du durcisseur en cohérence avec l'augmentation de la vitesse de prise du ciment. D'après l'étude RMN ^{31}P précédente la caséine n'a pas d'impact sur la réaction de prise, la modification du temps de prise n'est donc pas représentative d'une modification de la vitesse de prise du CPC.

Tableau 31 : Résumé des propriétés texturales des CPC-1C et CPC-2C

	CPC	**CPC-1C**	**CPC-2C**		
Na_2HPO_4 (%)	**0,5**	**0,5**	**0,5**	**2**	**5**
L/P	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
t_i* (min)	4 - 4,5	5,5 - 6,5	nd**	6 - 6,5	5,5
Injectabilité à 3 min (N)	10,4 ± 3	6,0 ± 0,8	nd**	10,1 ± 2,1	63,6 ± 17
Cohésion	Oui	Oui	/	Oui	Non

*t_i réalisé avec un second lot de ciment commercial
** non défini

Concernant l'injectabilité à 3 min, il est observé que l'ajout de caséine diminue également ce paramètre, en effet pour une valeur de 10,4 ± 3 N pour le CPC, elle est de 6,0 ± 0,8 N pour le

CPC-1C. Hors lors des essais avec un CPC ne contenant pas d'HPMC, l'injectabilité de la pâte était augmentée à cause de la tendance de la caséine à se lier au calcium en créant des agrégats. Il est connu que les protéines en présence de polysaccharides peuvent interagir par l'intermédiaire d'interactions répulsives ou attractives, le mélange de ces composés peut ainsi engendrer soit une co-solubilité, une co-agrégation ou une incompatibilité entraînant une séparation de phase des réactifs.[356,362] Dans un milieu dilué (comme c'est le cas ici), la co-solubilité des espèces est l'interaction la plus probable pouvant exister entre l'HMPC et la caséine. Pour les CPCs-2C, les mesures augmentent en fonction de la concentration en Na_2HPO_4. Cette augmentation est due au durcissement du ciment provenant d'une réaction de prise plus rapide. À ce temps (3 min), seul le CPC-2C(2) ne dépasse pas la limite fixée de 25 N, c'est pour cette raison que la travaillabilité du CPC-2C(5) ne sera pas étudiée.

La travaillabilité (Figure 106) a été étudiée avec un lot différent de ciment à celui utilisé pour la détermination des autres propriétés texturales. Le ciment contrôle possède un temps de prise de 8 min ce qui explique la diminution de l'injectabilité en fonction du temps. La caséine en co-solubilité avec l'HPMC joue le rôle de réofluidifiant, de ce fait, ce dernier modifie le temps de prise et par conséquent l'injectabilité à plus long terme. L'ajout de la caséine à 1 % sans modification du liquide durcisseur permet une injectabilité au-delà de 8 min comparé au ciment contrôle qui dépasse les 25 N (limite d'injectabilité) à ce même temps (Figure 106 A).

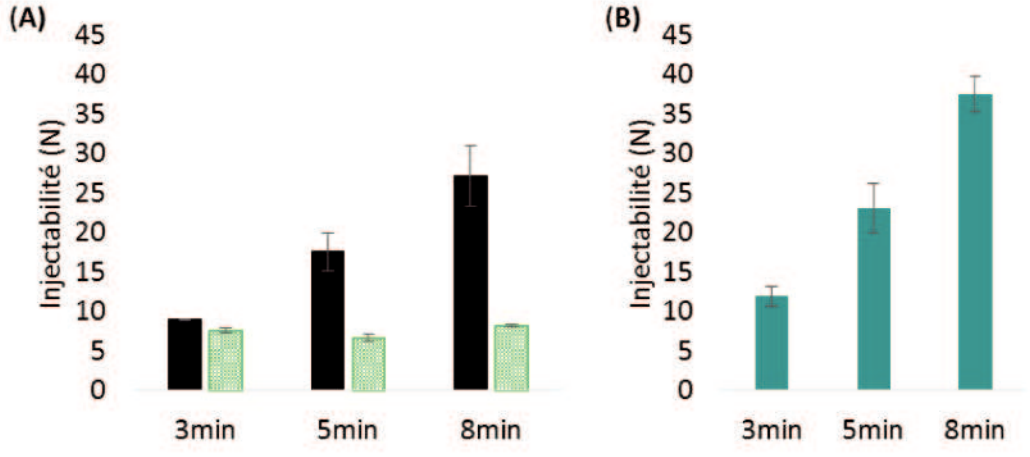


Figure 106 : Injectabilité des ciments : (A) CPC (noir) et CPC-1C (turquoise clair) et (B) CPC-2C(2) (turquoise foncé) en fonction du temps (3, 5 et 8 min)

Lors de la modification du liquide durcisseur à 2 % en Na_2HPO_4, le CPC n'est plus considéré comme injectable puisque la force pour extruder le biomatériau dépasse 25 N. Avec 2 % de

caséine dans la phase solide du biomatériau (Figure 106 B), le CPC est plus injectable comparé au matériau sans caséine. De plus, la force d'extrusion augmente en fonction de la vitesse de prise du ciment et ce dernier s'avère n'être plus injectable à partir 5 min. Pour l'ensemble des mesures, la totalité du biomatériau a été extrudée et aucun phénomène de démixtion n'a été observé.

En conclusion, la caséine quand elle est en présence d'HPMC modifie les propriétés texturales des CPCs les rendant plus injectables et cohésifs (Figure 107). Néanmoins, seul le CPC-2C(5) n'est pas cohésif après une injection à 3 min. En revanche, lorsque ce dernier est modelé (sous la forme d'une pastille par exemple), la tenue du biomatériau dans une solution saline n'est pas altérée.

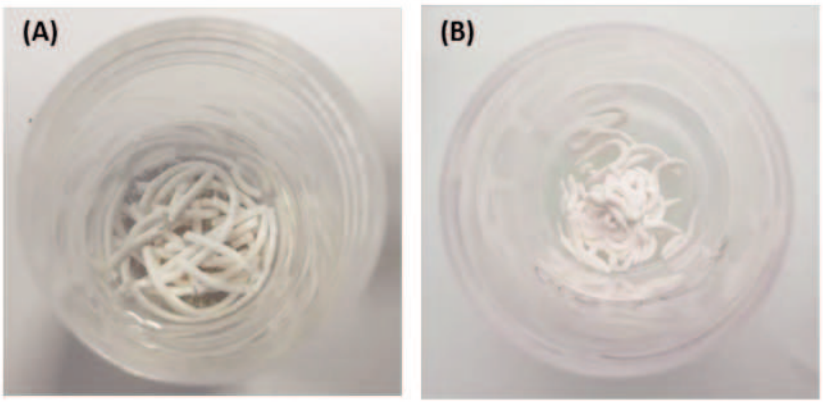


Figure 107 *: Photographies (A) d'un ciment contrôle* ; CPC (L/P = 0,45 avec Na_2HPO_4 à 0,5 %) et *(B) d'un* ciment chargé en caséine ; CPC-1C (L/P = 0,45 avec Na_2HPO_4 à 0,5 %), après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C

2.2.3. Influence de la caséine sur la structure du biomatériau

Précédemment nous avons vu que la caséine engendrait des modifications au niveau des propriétés texturales du CPC.

La résistance à la compression, elle, mesurée après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline (Figure 108 A) montre également des modifications significatives entre les CPCs chargés en caséine et leur contrôle respectif. Cette association entraîne une diminution de la résistance à la compression allant de 26,70 ± 2,36 MPa, 20,16 ± 1,17 et 19,23 ± 2,76 MPa pour les CPCs contrôles (durcisseur utilisé 0,5 ; 2 et 5 %) à 21,07 ± 2,31 MPa pour le CPC-1C et 13,58 ± 1,63 MPa pour le CPC-2C(2) et 10,98 ± 1,24 MPa pour le CPC-2C(5).

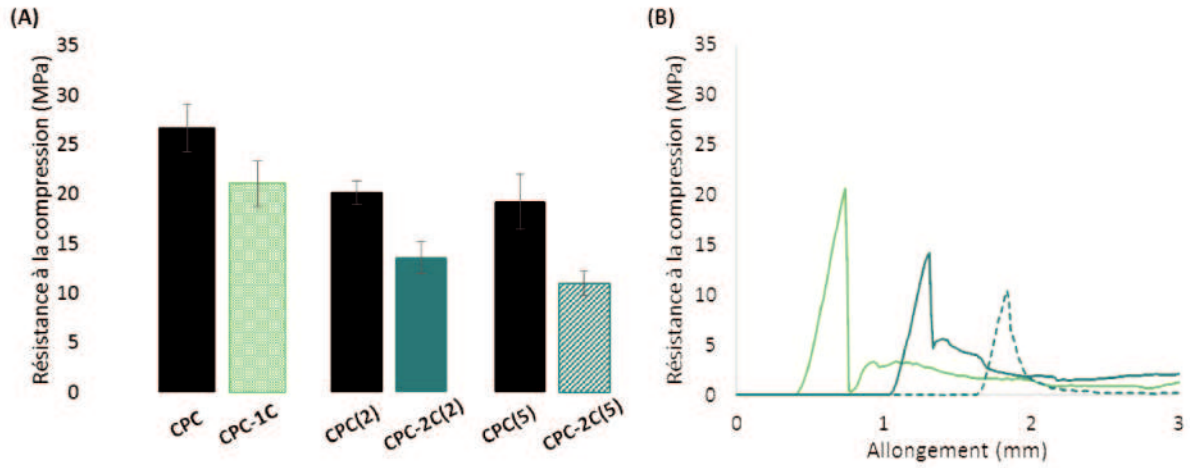


Figure 108 : (A) Résistance en compression des CPC-1C, CPC-2C(2), CPC-2C(5) et leur contrôle CPC, CPC(2) et CPC(5) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline et (B) courbes avec CPC-1C (turquoise clair), CPC-2C(2) (turquoise foncé) et CPC-2C(5) (turquoise pointillé)

Ainsi, la diminution de la résistance en compression peut être due à plusieurs facteurs comme la modification du caractère initialement fragile du matériau, une augmentation de la porosité, une interaction entre la caséine et le ciment qui impacte la cristallogenèse, ou alors à un emprisonnement de la protéine qui favorise la création de fractures préférentielles au sein du ciment pris. Les courbes des formulations des ciments chargés en caséine (Figure 108 B) sont typiques des matériaux fragiles. Par conséquent, il est possible d'exclure l'hypothèse d'un matériau devenu ductile.

Les résultats de mesures de pycnométrie sont référencés dans le Tableau 32 ci-après. Il est observé alors, que la densité vraie du CPC-2C(5) a augmenté par rapport aux autres CPCs (contrôle et combinés) alors que l'ajout de la caséine à 2 % devrait diminuer la densité finale du matériau. Cette augmentation est due à la réaction de prise du CPC plus avancé que les autres formulations et tend à se rapprocher de la valeur de la CDA (ρCDA = 2,79 g cm^3). Concernant la porosité, aucune différence n'a été observée entre les CPCs contrôles et chargés. Ces résultats ne justifient pas la différence observée sur la résistance en compression.

Tableau 32 : Densités et porosités des différents CPCs chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline

	CPC	CPC-1C	CPC-2C	CPC-2C
Na_2HPO_4 (%)	**0,5**	**0,5**	**2**	**5**
L/P	0,45	0,45	0,45	0,45
ρ_{vraie} (g/cm^3)	2,61	2,63	2,61	2,68
Porosité à 72 h (%)	49,5	49,9	50,9	50,3

La structure vue par microscopie sera présentée a posteriori (Figure 121, page 211), néanmoins en comparant les CPCs contrôles aux CPCs associés à la caséine il est possible d'affirmer que cette protéine ne modifie pas la cristallogenèse de la CDA.

Aucune trace de caséine n'a été observée par analyse MEB. Pour l'observer, nous avons réalisé la dissolution des pastilles de ciment (diamètre : 8 mm, hauteur : 5 mm) des différentes formulations dans une solution de HCl à 5 % (pH = 1) pendant 24 h. Après ce délai, la pastille du ciment contrôle est totalement dissoute, en revanche pour celles des formulations de CPCs contenant de la caséine, la forme de la pastille est toujours présente (Figure 109). Celle-ci est due à la précipitation des caséines à pH acide puisque le point isoélectrique de ces protéines est de 4,6. Il est possible d'en déduire alors que la caséine forme un « réseau » à l'intérieur du ciment engendrant ainsi des ruptures préférentielles diminuant ainsi la résistance à la compression. Cette manipulation a été réalisée 3 fois pour les CPC-1C, CPC-2C(2) et CPC-2C(5). L'intégrité de la caséine sera étudiée dans la partie 3.1. présentée ci-après.

Figure 109 *: Photographie d'une pastille de ciment combiné avec de la caséine après dissolution du* phosphate de calcium par une solution de HCl à 5 %

En conclusion, la caséine ne modifie pas la nature du produit final obtenue après la prise du ciment. En revanche, son existence en co-solubilité avec l'HPMC joue un rôle sur les propriétés texturales du ciment, le rendant plus injectable. L'ajustement de la concentration en Na_2HPO_4

de la solution de durcisseur a donc été réalisé dans le but d'obtenir des temps de prise équivalents au CPC contrôle. Pour finir, concernant les propriétés texturales, seule la résistance mécanique est impactée par la formation d'un « réseau » de caséine dans le CPC.

3. Intégrité de la caséine au sein du ciment

3.1. Après association

Le ciment dissous par une solution d'HCl à 5 □ a laissé un « réseau » organique de caséine. Afin d'étudier ce dernier, plusieurs analyses ont été effectuées. Tout d'abord, les pastilles sont sorties de la solution d'HCl et placées dans une étuve à 37 °C pendant une journée. La forme n'ayant pas été conservée par ce mode de séchage et le disque est donc broyé. La poudre résultante a été analysée par microcopie à balayage en mode rétrodiffusé et spectrométrie EDX et par spectroscopie IR.

L'utilisation des électrons rétrodiffusés en microscopie permet d'obtenir un contraste de composition. Ainsi, les cristaux organiques (avec un Z faible) apparaissent plus foncés alors que ceux inorganiques (avec un Z élevé) sont visualisés de manière plus claire. Les photographies MEB (non présentées) ont montré des grains foncés représentatifs d'une structure organique.

L'analyse EDX n'a montré que de faibles traces de phosphore et de calcium indiquant la dissolution quasi-totale du CPC, le reste étant caractéristique de molécules organiques.

L'analyse IR (Tableau 33) permet d'observer de légères modifications entre la poudre de caséinate de sodium et le « réseau » de caséine séché. Par exemple, la bande d'élongation du groupement N-H pour la poudre de caséinate de sodium a été associée à des groupements N-H non liés alors que celle du réseau centrée à 3324 cm^{-1} a été attribuée à des liaisons H intra et intermoléculaires.[363] Les bandes entre 1700 et 1400 cm^{-1} communes aux protéines telles que celles de la bande d'élongation du groupement carbonyle (νC=O, amide I) sont restées semblables pour les deux formes de caséine. En revanche, il est possible d'observer un léger décalage d'environ 20 cm^{-1} pour les bandes d'élongation des groupements C-N, C-O et celles des déformations CH_x entre les deux formes de caséine. Ce décalage peut être dû soit à la différence de pH puisque dans un cas nous observons un caséinate et dans l'autre une caséine acide soit aux contre-ions sodium qui assurent l'électroneutralité dans la poudre de caséinate.

Tableau 33 : Résumé des principales bandes de vibrations des différents groupements du caséinate de sodium et du réseau de caséine[363–365]

Groupement	**Caséinate de sodium** Nombre d'onde (cm^{-1})	**« Réseau » de caséine** Nombre d'onde (cm^{-1})
N-H	3324	3412
C=O (Amide I)	1658	1650
C-N-H (Amide II)	1548	1547
CH_2	1455	1455
O-C-O	1403	1408
C-N (Amide III)	1250	1223
C-O	1093	1117
CH_x	980	956

En résumé, les analyses MEB et EDX permettent de mettre en évidence le caractère organique du « réseau » obtenu après dissolution du CPC alors que l'analyse IR montre qu'il s'agit bien d'un « réseau » de caséine.

3.2. Après irradiation gamma

La prévention d'agents pathogènes, pour les dispositifs médicaux, passe par une étape obligatoire de stérilisation. La vapeur d'eau et l'oxyde d'éthylène étant à exclure, seule la stérilisation gamma est envisagée. Ainsi, dans le but d'étudier ce système combiné dans sa globalité, une étude sur la stérilisation gamma de la caséine a été réalisée.

3.2.1. Procédure analytique

3.2.1.1. Source γ

L'irradiateur γ, est un dispositif permettant l'irradiation d'échantillon provenant de divers domaines tels que la biologie, la physique ou encore la chimie. La caséine a été irradiée à l'aide d'un irradiateur GSR D1 (Gamma Service Medical gmbh) au cyclotron ARRONAX à Nantes (Figure 110). Ce dispositif dédié à la recherche contient trois sources scellées de Césium-137 dont la période de demi-vie est de 30,15 ans. Cet isotope radioactif est un émetteur de rayons β d'énergie E_β = 185 keV accompagné dans la majeure partie des cas de l'émission de rayons γ d'énergie E_γ = 661,6 keV. L'activité maximale des trois sources réunies était de 123,4 TBq en 2012. L'avantage de cet appareil d'irradiation est la possibilité de produire un débit de dose faible qui permet ainsi une irradiation de l'ordre de quelque Gray (Gy). La durée de l'irradiation pouvant durer de quelques minutes à quelques années. De plus, l'irradiateur comporte plusieurs

niveaux permettant ainsi, de moduler la dose reçue en fonction de la position des échantillons. Dans notre étude, les échantillons seront placés sur le niveau 0 de l'appareil.

Figure 110: Irradiateur gamma

La détermination du débit de dose délivrée par l'irradiateur γ passe par différents types de dosimétrie en fonction de la nature de l'échantillon (liquide ou solide). Ainsi, les dosimétries existantes sont : les films radiochromiques, la dosimétrie en gel polymérique, la dosimétrie de Fricke[366] et la dosimétrie solide à l'alanine qui seront détaillées dans la partie ci-après.

3.2.1.2. Dosimétrie liquide et solide

L'étude du comportement des potentiels produits de dégradation de la caséine soumis aux rayonnements γ, nécessite de connaître la dose absorbée par le système. Cette information est indispensable à notre étude pour pouvoir quantifier les productions des espèces issues de la radiolyse de nos échantillons. Pour ce faire, une dosimétrie solide à l'alanine a été mise en place.

La dosimétrie solide à l'alanine consiste en l'irradiation d'une poudre de l'acide aminé L-α-alanine dans le but de former le radical alkyle stable sous rayonnement ionisant. L'analyse du radical est ensuite réalisée par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE).

Dans la majorité des cas, l'alanine est vendue sous forme de pastille calibrée et pesée dont la concentration en radicaux formés est connue en fonction de la dose absorbée, ce qui permet à l'utilisateur de remonter facilement à la dose absorbée par l'échantillon. Le calcul de la dose D

nécessite de connaître la concentration en radical formé [X], le rendement radiolytique g(X) et la masse volumique de l'espèce ρ à un temps d'irradiation donné.

$$D = \frac{[X]}{g(X) \times \rho}$$

Afin d'établir cette dosimétrie sans avoir recours à ces pastilles, le rendement radiolytique de l'alanine a dû être déterminé. Pour ce faire, la dose reçue par les échantillons a été calculée via une dosimétrie liquide (décrite ci-dessous) et la quantité de radicaux formés a été déterminée à l'aide d'une double intégration (DI) des spectres RPE en utilisant une solution de (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy (TEMPO) pour référence [367]. Pour finir, 2 g d'alanine ont été irradiés pour des temps allant de 10 min à 60 min. Soit une gamme de dose couverte de 60 à 600 Gy, cohérente avec les doses utilisées en stérilisation des DM.

La dosimétrie de Fricke a été utilisée pour effectuer une mesure de la dose. Cette méthode repose sur le principe de l'oxydation des ions ferreux Fe(II) en ion ferrique Fe(III) par les espèces oxydantes issues de la radiolyse de l'eau.

La solution de Fe(II) est composée d'un mélange d'une solution aqueuse de sel de Mohr $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ à 10^{-3} mol.L^{-1}, d'acide sulfurique H_2SO_4 à 0,4 mol.L^{-1} et de NaCl à 10^{-3} mol.L^{-1}. Les solutions ont ensuite été irradiées pour des temps allant de 10 min à 60 min, le but étant d'avoir au minimum 3 valeurs de dose pour une position donnée. Les ions Fe(III) ont été dosés par spectrométrie d'absorption UV-Visible à 304 nm.
Expérimentalement, le coefficient d'extinction molaire ε_{304nm} a été déterminé à 2203 L.mol^{-1}.cm^{-1} à l'aide d'une gamme d'étalonnage d'une solution en ions ferriques. La dose a ensuite été calculée à partir de la mesure de l'absorbance des ions ferriques par spectrométrie UV-visible, en s'appuyant sur la loi de Beer-Lambert :

$$D = \frac{[Fe^{3+}]}{g(Fe^{3+}) \times \rho} = \frac{A}{\varepsilon \times l \times g(Fe^{3+}) \times \rho}$$

Dans le cas des rayons γ du césium 137, le rendement radiolytique du fer est de 15,6 molécules/100 eV soit 1,62 µmol/J.[368] Par la suite, il a été possible de tracer la courbe D = f(t) dont la pente correspond au débit de dose (DdD). Dans nos conditions expérimentales, une incertitude de ± 5 % a été considérée, prenant en compte les erreurs dues à l'intensité de l'irradiation (angle solide), de la mesure spectroscopique, des préparations et des prélèvements des solutions.

3.2.1.3. Spectrométrie de résonance paramagnétique électronique

Les spectres RPE des échantillons de caséine irradiés ont été acquis à l'aide d'un spectromètre Bruker (modèle EMX+, cavité haute sensibilité HS4119) à ARRONAX. Avant leur analyse, les échantillons ont été broyés afin d'éviter les orientations préférentielles. La technique RPE mesure une quantité absolue (nombre de moles) de radicaux et non une concentration. Les quantités d'alanine insérées dans les tubes échantillons ont donc été pesées avant mesure pour une normalisation des résultats en fonction de la masse. Les paramètres d'optimisation qui ont été utilisés sont les suivants : bande X (9,6 GHz), puissance variant de 0,08 mW à 100 mW et 4 scans de 10 minutes par échantillon. Le balayage du champ magnétique variait de 325,0 mT à 345,0 mT pour les échantillons de TEMPO et d'alanine et de 0 à 1000 mT pour les échantillons de caséine.

L'étalonnage du signal RPE pour la quantification des radicaux a été effectué par double intégration des spectres de TEMPO. Ces derniers ont été acquis à partir d'une gamme de dilution allant de 2.10^{-5} à 10^{-4} $mol.L^{-1}$. Pour finir, les tubes RPE ont été remplis par 100 µL de la solution.

Tous les spectres d'alanine et TEMPO présentés ont été enregistrés à température ambiante et dans des conditions de puissance micro-onde non-saturantes contrôlées.

3.2.1.4. Microchromatographie en phase gazeuse (µGC)

Dans le but d'étudier les gaz formés (H_2 et CO_2) lors de l'irradiation de la caséine, il est nécessaire d'utiliser comme méthode d'analyse la µGC. Ces analyses ont été réalisées avec une 490 micro-GC (Agilent). Cette technique analytique permet la séparation et la quantification d'espèce sous forme gazeuse, en se basant sur la différence d'affinité de chaque espèce avec la phase stationnaire de la colonne capillaire (Molsieve 5A, 0.32 mm x 4 m) et leurs propriétés intrinsèques. La température est fixée pour l'injecteur à 180 °C et à 60 °C pour le four. Les gaz sont, par la suite, détectés par un TCD (thermal conductivity detector), qui a pour principe de fonctionner sur le changement de conductibilité thermique entre le gaz vecteur (ici Argon pur à 99,9999 □) et l'analyte élué.

Les échantillons ont été irradiés en contenant en verre fermé sous air ambiant, c'est-à-dire en présence d'oxygène, de ce fait les quantités de CO_2 et de H_2 présentes dans l'atmosphère seront enlevées pour la présentation des résultats.

3.2.1.5. LC/MS

La caséine irradiée a également été étudiée par RP-HPLC (Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography) couplé à une spectrométrie de masse ESI-Q-TOF (Electrospay ionization Quadrupole Time of Flight) selon une méthode mise en place au laboratoire STLO.[369] Les instruments utilisés sont les suivants : une chromatographie HPLC (1100 Agilent Technologies) équipée d'une colonne C4 (VYDAC, Grace®) et un spectromètre de masse Q-TOF (QSTAR XL, AB Sciex) équipé d'une source ESI.
La caséine irradiée et son contrôle non irradié ont été dissous à 1 µg/L dans de l'eau UP puis diluée à 1/10 dans un mélange de 0,1 □ de TFA avec de l'eau UP. Il est possible de retrouver la totalité du protocole expérimental dans la publication de Gaucheron et al.[369]

3.2.2. Résultats

3.2.2.1. Mise en place de la dosimétrie solide

La mise en place de la dosimétrie solide à l'alanine nécessite plusieurs étapes (i) de déterminer l'énergie absorbée par l'alanine via la dosimétrie de Fricke et (ii) de calculer la quantité de radicaux formés à partir d'une solution de TEMPO servant de référence.

La dosimétrie de Fricke nous a permis d'obtenir des débits de dose de l'ordre de 9,6 ± 0,5 Gy/min pour chaque position utilisée dans l'irradiateur.

Le spectre RPE du TEMPO présenté Figure 111 comporte 3 raies représentatives de la délocalisation de la densité de spin de l'oxygène vers l'azote. On observe alors un spectre typique de radical à g = 2 et le couplage hyperfin lié à l'interaction du spin électronique du radical avec le spin nucléaire (I = 1 Abondance isotopique : 99.6□) de l'azote 14. Ensuite, la quantité de radicaux formés est déterminée à l'aide d'une double intégration notée DI du spectre. Il est alors possible, grâce à cela, de tracer la droite DI = f(N) avec N le nombre de mole de TEMPO. On obtient alors une valeur de $2{,}06.10^{16}$ u.a.mol^{-1} qui nous permettra par la suite de calculer le nombre de mole de radical alanine obtenu après irradiation.

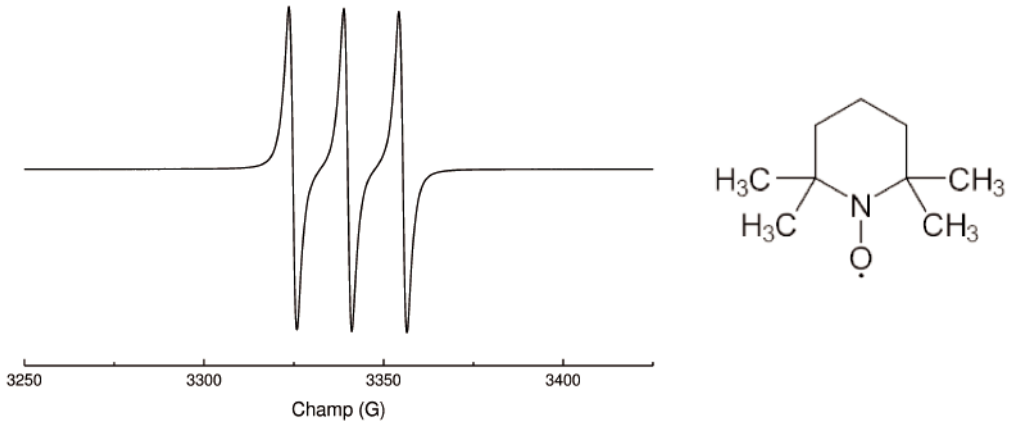


Figure 111 : (A) Signal RPE et (B) radical du TEMPO

La Figure 112 présente le signal RPE du radical de l'alanine formé après irradiation γ. La dosimétrie de Fricke permet de remonter à l'énergie déposée sur l'échantillon d'alanine à chaque temps d'irradiation. Par exemple, à 10 min d'irradiation l'énergie reçue est de $1{,}92.10^{-1}$ J (E = DdD*t*m avec DdD = 9,6 ± 0,5 Gy/min, t = 10 min et m = 2.10^{-3} kg).

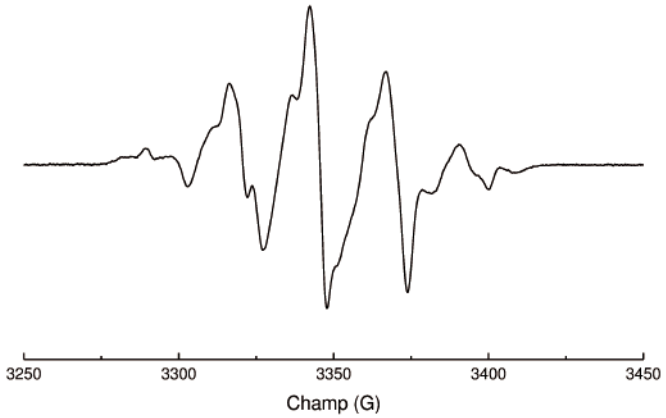


Figure 112 *: Signal RPE du radical de l'alanine formé après irradiation γ*

Concernant, la quantité de radical formée, la DI de chaque spectre RPE de ce dernier est calculée puis normalisée en fonction de la masse introduite dans le tube RPE. La quantité (en mole) est obtenue en divisant la DI par $2{,}06.10^{16}$ u.a.mol^{-1}.

Pour finir, le rendement radiolytique est obtenu en traçant la droite du nombre de mole de radical formé en fonction de l'énergie absorbée par l'échantillon. Ainsi, on obtient g(alanine) = $6{,}77.10^{-7}$ mol/J soit 0,7 µmol/J.

3.2.2.2. RPE

La RPE est une technique d'analyse souvent utilisée dans l'étude de formation de radicaux libre d'échantillon solide après irradiation [370]. Les spectres RPE de la caséine présentés sur la Figure 113 ont été enregistrés à 100 K dans le but de détecter un maximum de radicaux.
On obtient alors le spectre suivant (Figure 113 A) qui présente l'apparition d'une bande similaire pour la caséine irradiée à 1 et 3 jours indiquant que la formation de radicaux ne semble pas être affectée par la dose reçue (13,1 ± 0,6 kGy) par l'échantillon. L'augmentation de la puissance permet de mettre en exergue certaines bandes par rapport aux autres. Ainsi, il est remarqué sur la Figure 113 B qu'une des bandes semble d'avantage affectée par l'irradiation (dose absorbée de 42,9 ± 2,1 kGy) alors que l'intensité de l'autre n'a pas changé.

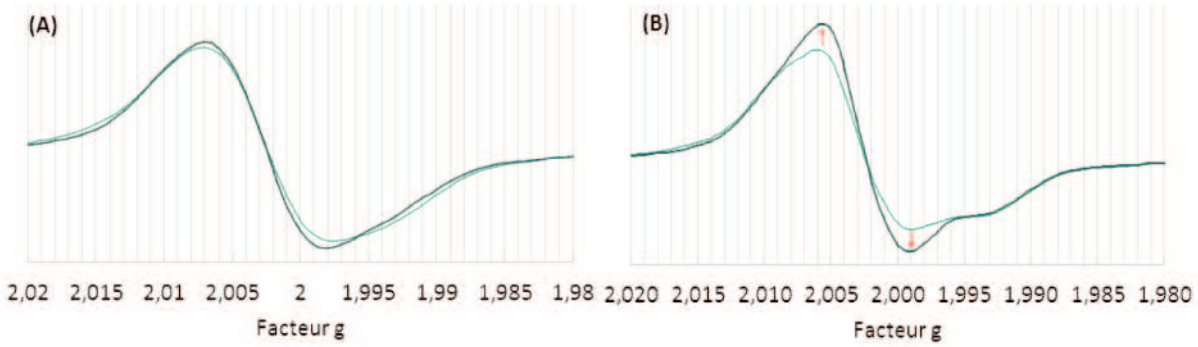


Figure 113 : Signal RPE enregistré à 100K de la caséine après 1 j (turquoise) et 3 j (bleu foncé) *d'irradiation (A) à une* puissance de 0,08 mW et (B) à une puissance de 100 mW

Dans la littérature, la majorité des radicaux formés à partir d'acides aminés ont des valeurs de g situées autour de 2,0039.[371] En 1981, une étude a montré la formation d'un radical « caséine » provenant de la pyrolyse de cette dernière.[372] Néanmoins, la valeur du g (2,0053) reste plus élevée que la valeur que nous obtenons (g = 2,003 : valeur centrale de la courbe A), ne nous permettant pas d'identifier les espèces radicalaires obtenues après l'irradiation gamma.

3.2.2.3. µGC

La production d'espèce gazeuse lors de l'irradiation d'un matériau est un événement fréquemment observé.[370] Dans l'optique d'étudier le sujet dans sa globalité, nous avons procédé à des dosages de H_2 et de CO_2 par µGC qui sont susceptibles d'être des produits de dégradation de mes produits sous irradiation. Les résultats sont représentés sur la Figure 114.

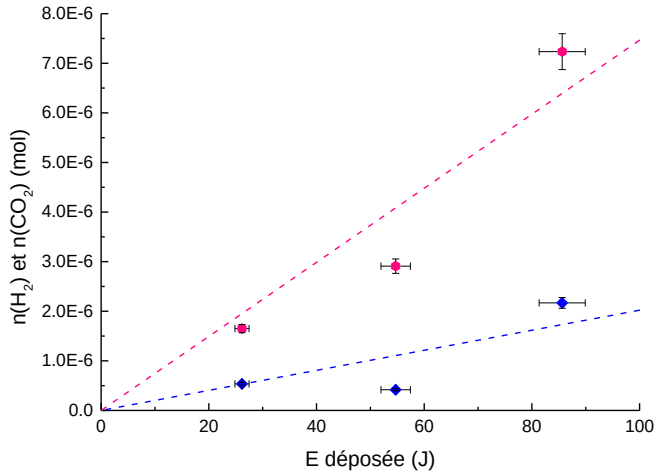


Figure 114 : Étude de la formation de H_2 (en bleu) et de CO_2 *(en orange) en fonction de l'énergie* absorbée par la caséine

Cette figure montre clairement la production de H_2 et de CO_2 provoquée par l'irradiation γ de la caséine. Au vu des résultats obtenus, il n'est pas possible de déterminer les rendements radiolytiques de production avec précision, néanmoins il est possible d'en estimer les valeurs suivantes soit 0,020 µmol/J pour le H_2 et 0,075 µmol/J pour le CO_2.
Une irradiation d'un mélange de ciment et de caséine (94:6) a été réalisée et montre des valeurs de rendement inférieur à ceux obtenues avec la caséine seule (0,013 µmol/J pour le H_2 et 0,020 µmol/J pour le CO_2). Ce résultat montre que le ciment joue le rôle d'un écran pour la caséine vis-à-vis de l'irradiation et ainsi limite la formation de gaz et donc de radicaux.

3.2.2.4. LC/MS

Les chromatogrammes obtenus avant et après irradiation sont présentés Figure 115 ci-après. Ces derniers présentent une enveloppe de multiples pics dont l'attribution a été réalisée dans l'étude de Gaucheron et al.[369] Néanmoins, il est possible d'apprécier une différence d'intensité des pics de la caséine avant et après irradiation, avec une dose absorbée de 42,9 ± 2,1 kGy. La diminution et l'élargissement des pics pourraient provenir d'une fragmentation des acides aminés présents dans la structure des caséines. Pour la suite, 3 régions ont été analysées par spectrométrie de masse soit entre (i) 14 et 19 min (ii) 19 et 23 min et (iii) 23 et 27 min.

Les spectres de masses non présentés possèdent de fortes similitudes. En résumé, les régions entre 19 - 23 min et 23 - 27 min présentent des spectres identiques avec cependant des intensités moindres dans le cas de la caséine irradiée. Pour la région 14 - 19 min les spectres sont semblables avec cependant l'apparition de 3 pics à m/z = 1266, 70 (z=3), 1326,72 (z=3) et

1429,78 (z=3) non présents dans le spectre de la caséine non irradiée. Cependant, ces fragments n'ont pas pu être identifiés.

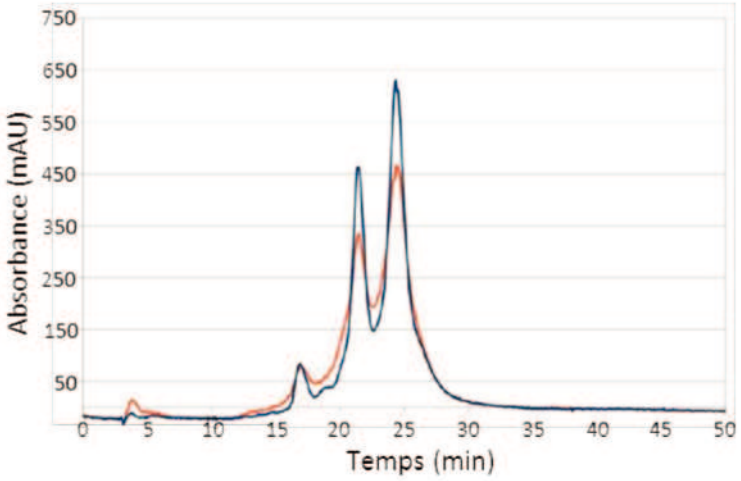


Figure 115 : Chromatogrammes de la caséine non irradiée (bleu) et irradiée (rouge)

En conclusion, l'irradiation gamma de la caséine semble impacter que légèrement la caséine en créant des petits radicaux encore non identifiés. Le temps de prise et l'injectabilité ont été vérifiés après 1, 2 et 3 jours d'irradiation gamma. Ces propriétés n'ont pas été affectées par la stérilisation ce qui est encourageant vis-à-vis de cette association.

4. Études de la libération de la caséine in vitro

Une quantité (1,2 g) de ciment est utilisée dans le but de former trois pastilles (le protocole est similaire à celui décrit au chapitre II). Après une prise de 30 min à température ambiante, les pastilles sont démoulées, pesées et immergées dans une solution saline (0,9 % w/w, 10 mL). Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37 °C, elle-même placée sur un agitateur orbitalaire (90 tr/min). Des prélèvements de 6 mL de la solution sont effectués régulièrement au cours de l'expérience et la quantité prélevée est immédiatement renouvelée par de la solution fraîche. Les solutions prélevées sont ensuite filtrées (nylon, 0,45 µm) afin d'éliminer de potentielles particules de ciments qui pourraient altérer les mesures. La caséine libérée est analysée par spectrométrie UV-visible.

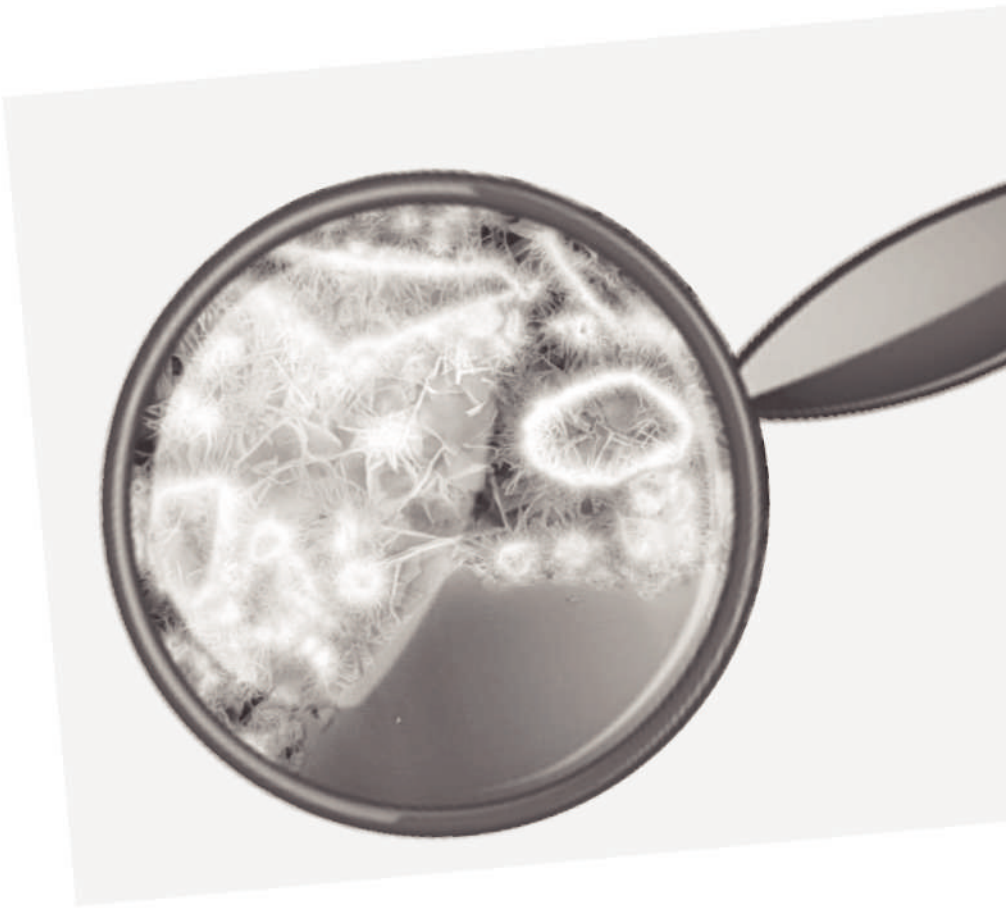
Après 1 semaine de libération, les résultats obtenus montrent que la caséine n'est pas libérée du CPC et ce, quelle que soit la formulation étudiée. Il est fort probable que la phosphorylation de ces protéines engendre des liaisons avec le calcium contenu dans le ciment.

5. Conclusions

L'association de la caséine avec un CPC contenant un rhéofluidiant tel que l'HPMC ne modifie pas la nature du produit final obtenue après la prise du ciment. En revanche, l'interaction entre cette protéine et l'HPMC engendre des modifications sur les propriétés texturales du ciment, le rendant plus injectable et cohésif. Pour l'ajout de la caséine à 2 □, une optimisation de la concentration en Na_2HPO_4 de la solution de durcisseur a été effectuée afin d'acquérir des temps de prise équivalents au CPC contrôle. Pour finir, la résistance mécanique est impactée par la formation d'un « réseau » de caséine au sein de la structure du CPC.

L'intégrité de la caséine étudiée après stérilisation gamma montre que la protéine est impactée par le rayonnement. L'identification des radicaux formés est encore en cours, néanmoins les propriétés texturales du système combiné ne semblent pas être affectées.

Partie C : Formulation et caractérisations physico-chimiques de ciments PCa chargés en caséine et en maltolate de gallium



1. Formulation de CPCs combinés avec de la caséine et du maltolate de gallium

La formulation a été réalisée à partir des ciments réalisés partie A et B. Le complexe GaM est alors directement ajouté sous forme de poudre à la phase solide du mélange à 7 % en masse aux formulations CPC-1C, CPC-2C(2) et CPC-2C(5). Les mélanges sont, par la suite, homogénéisés à l'aide d'un agitateur tridimensionnel pendant 1 h à une vitesse de 50 tr/min. Ensuite, la pâte de ciment est préparée en gâchant la poudre avec une solution de durcisseur dont la concentration en Na_2HPO_4 varie en fonction du mélange ciment/caséine, le rapport L/P = 0,45 reste en revanche le même pour chaque formulation. Les formulations des CPCs sont les suivantes (Tableau 34).

Tableau 34 : Résumé de formulations étudiées

Nom	Ciment	PA (%)	Na_2HPO_4 (%)	L/P
CPC-1C-7G	GQS	Caséine (1 % w:w) GaM (7 % w:w)	0,5	0,45
CPC-2C-7G(2)	GQS	Caséine (2 % w:w) GaM (7 % w:w)	2	0,45
CPC-2C-7G(5)	GQS	Caséine (2 % w:w) GaM (7 % w:w)	5	0,45

2. Étude des propriétés physico-chimiques du ciment chargé

2.1. Influence sur la réaction de prise et le produit final

Les diffractogrammes des formulations CPC, CPC-1C et CPC-1C-7G sont présentés Figure 116. Il est observé ainsi les raies représentatives de la CDA, de l'α-TCP et du DCPA sur la totalité des diffractogrammes. Les raies représentatives de la CDA indiquent la réaction d'hydrolyse et les raies d'α-TCP montrent que cette dernière n'est pas totale. Néanmoins l'ajout du GaM en plus de la caséine ne semble pas modifier l'avancement de la réaction. Les raies représentatives du GaM à 9,56 ; 12,89 ; 14,73 et 23,12° 2θ indiquent la présence du complexe au sein du biomatériau après 72 h de prise dans NaCl. Les résultats obtenus pour les CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) sont semblables à ceux décris ci-dessus et ne sont donc pas présentés. Il en va de même pour les analyses IRTF ci-après.

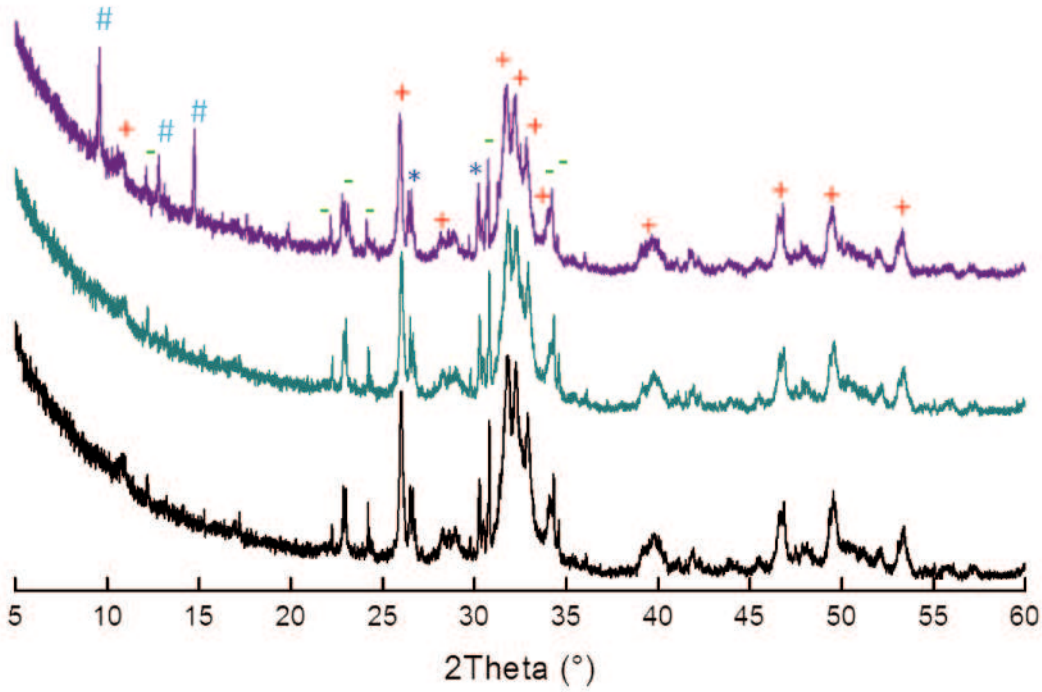


Figure 116: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en caséine et en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-1C (turquoise), le CPC-1C-7G (violet), + pic *de l'apatite, - pic de l'α*-TCP, * pic de la monétite et # pic du GaM

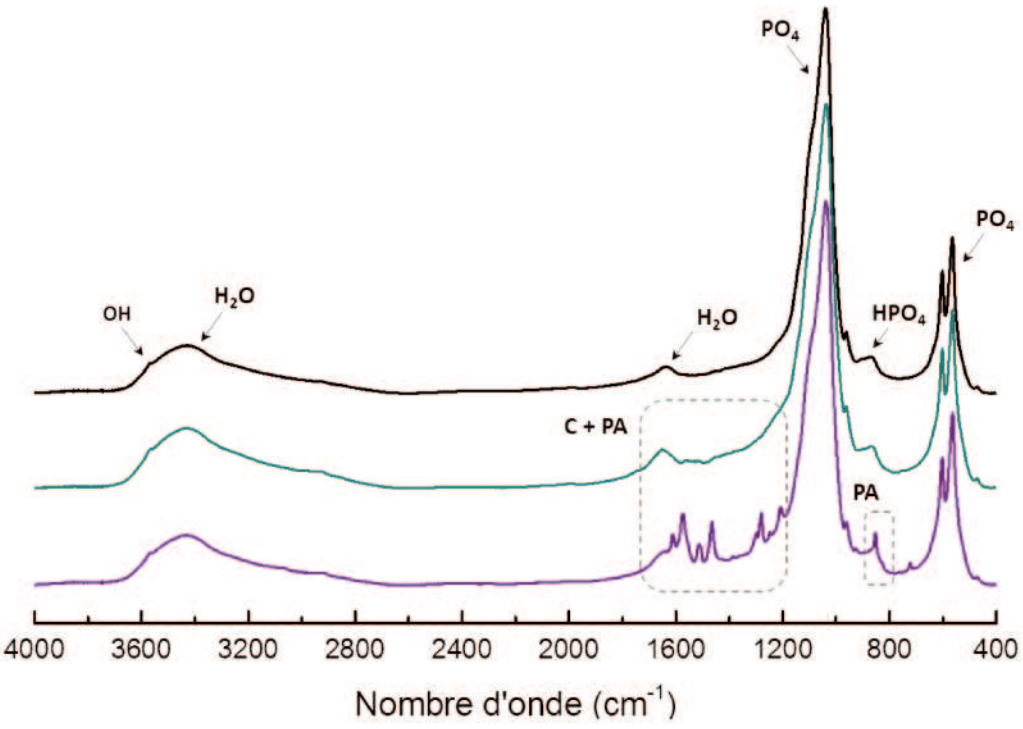


Figure 117 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en caséine et en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-1C (turquoise), le CPC-1C-7G (violet) et - - - zone de visualisation de la C et du PA

À l'instar des analyses IRTF des CPC-7G et CPC-1C des parties A et B de ce chapitre, l'analyse IRTF (Figure 117) confirme la présence de CDA après la prise du ciment pour le ciment CPC-1C-7G. Les bandes représentatives de l'eau entre 3500 - 3000 cm^{-1} et 1700 - 1600 cm^{-1}, celles représentant les vibrations des groupements PO_4^{3-} situées entre 1200 - 950 cm^{-1} et 650 - 500 cm^{-1}, celles des vibrations des groupements HPO_4^{2-} de l'apatite entre 900 - 800 cm^{-1} et pour finir, la bande du groupement hydroxyle de l'hydroxyapatite à 3570 cm^{-1} sont également observables sur ce spectre. Le GaM peut être distingué via les bandes entre 1700 - 1200 cm^{-1} ainsi que vers 900 cm^{-1} en accord avec le spectre IRTF du complexe pur.

La présence de CDA et de DCPA est mise en évidence grâce à l'analyse par RMN ^{31}P à l'état solide (Figure 118) dans toutes les formulations de CPCs chargés en caséine et en GaM. La déconvolution présentée sur chaque spectre permet d'obtenir la proportion en CDA au sein des biomatériaux combinés. Ainsi, les pourcentages de CDA obtenu sont les suivants (i) 67 % pour le CPC-1C-7G (ii) 66 % pour le CPC-2C-7G(2) et (iii) 73 % pour le CPC-2C(5). Pour chaque formulation le pourcentage de CDA obtenu est similaire au contrôle sans GaM et également à celui sans caséine. Les différents composants n'ont donc aucune influence sur la prise du biomatériau.

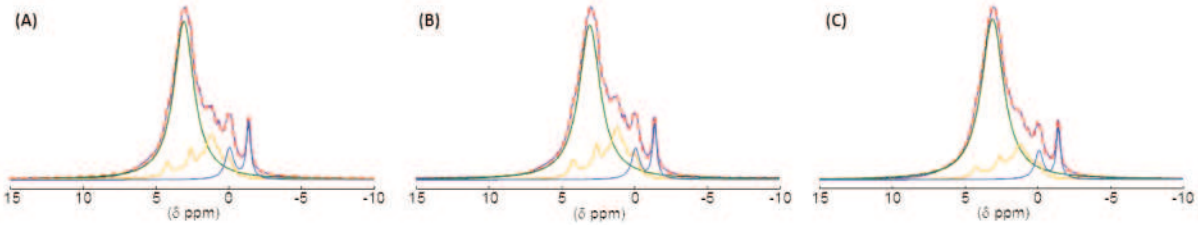


Figure 118 : Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC combiné (violet) avec (A) CPC-1C-7G, (B) CPC-2C-7G(2) et (C) CPC-2C-7G(5), la déconvolution (rouge), la CDA (vert), *l'*α-TCP (jaune) et le DCPA (bleu)

En conclusion, à l'image des résultats des parties A et B de ce chapitre, le GaM et la caséine ne modifient pas la prise du ciment et le produit final reste inchangé.

2.2. Influence du maltolate de gallium sur les propriétés texturales du CPC

La caséine modifiant la totalité des propriétés texturales, les CPCs chargés en caséine serviront de référence, les résultats pour le CPC-7G seront rappelés pour chaque propriété.

Il est possible d'observer que le temps de prise de chaque formulation chargée en caséine et GaM est augmenté par rapport à son contrôle chargé en caséine (Tableau 35). Les analyses RMN ^{31}P ont montré que la réaction de prise n'était pas altérée par l'ajout des différents

composants organiques. Cette diminution du temps de prise n'est donc pas représentative de la modification de la vitesse de prise du CPC mais de la quantité de matière organique (11 % au total) qui rend la formation et l'enchevêtrement des cristaux plus difficiles.

Tableau 35 : Résumé des propriétés texturales des CPCs chargés en GaM et en caséine

	Na_2HPO_4 (%)	L/P	t_i (min)	Injectabilité à 3min (N)	Cohésion
CPC-1C	**0,5**	0,45	5,5 - 6,5	6,0 ± 0,8	Oui
CPC-1C-7G	**0,5**	0,45	8,5 - 9,5	3,8 ± 0,4	Oui
CPC-2C(2)	**2**	0,45	6 - 6,5	10,1 ± 2,1	Oui
CPC-2C-7G(2)	**2**	0,45	6,5	10,4 ± 0,4	Oui
CPC-2C(5)	**5**	0,45	5,5	63,6 ± 17	Non
CPC-2C-7G(5)	**5**	0,45	6-7	35,1	Non

L'ajout du GaM en plus de la caséine diminue également l'injectabilité à 3 min des différentes formulations. Des valeurs drastiquement différentes sont obtenues entre les trois formulations de CPCs. Le CPC-1C-7G à 3 min possède une injectabilité de 3,8 ± 0,4 N, cette valeur est relativement faible et il est préférable d'attendre quelques minutes avant d'extruder la pâte. Néanmoins sa cohésivité reste très adéquate (Figure 119 A). Pour le CPC-2C-7G(2), la mesure n'est pas différente de la formulation avec la caséine seule et offre également une pâte avec une bonne tenue à court et à long terme (Figure 119 B). Pour finir, la formulation CPC-2C-7G n'est pas injectable manuellement puisqu'elle dépasse la valeur limite de 25 N. Néanmoins ce dernier peut s'avérer cohésif s'il est travaillé en le modelant avant son temps de prise initial.

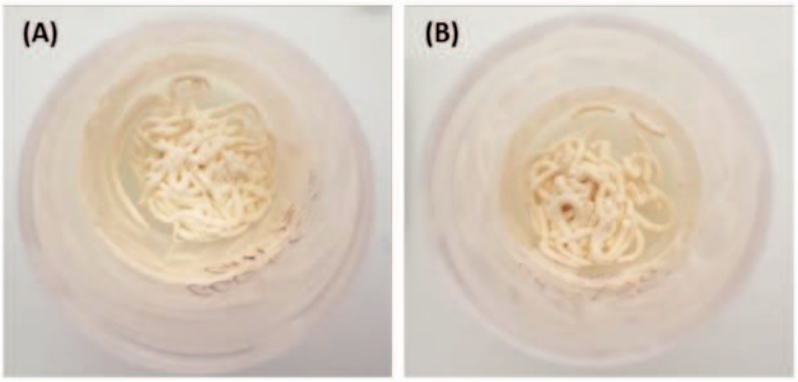


Figure 119 : Photographies de ciments chargés en caséine et en GaM après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C (A) CPC-1C-7G et (B) CPC-2C-7G(2)

2.3. Influence du maltolate de gallium combiné à la caséine sur la structure du biomatériau

Nous avions vu dans les parties précédentes que le GaM et la caséine engendraient des modifications au niveau des propriétés mécaniques du CPC par l'intermédiaire de ruptures préférentielles. La résistance à la compression des formulations chargées des deux PA (caséine + GaM) a donc été mesurée après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline (Figure 120). Une différence significative entre les CPCs chargés et leur contrôle est observable pour chaque formulation. De plus, cette association entraîne une diminution d'autant plus importante dans le cas de la combinaison avec le GaM et la caséine. Les résistances mécaniques pour ces formulations sont les suivantes 21,14 ± 2,76 MPa pour le CPC-1C-7G, 10,66 ± 1,38 MPa pour le CPC-2C-7G(2) et 8,87 ± 1,39 MPa pour le CPC-2C-7G(5). Les résultats pour les autres CPCs sont décrits dans la partie B page 191. L'allure des courbes (non présentées) est typique de matériaux fragiles faisant apparaître une rupture nette au sommet de la courbe.

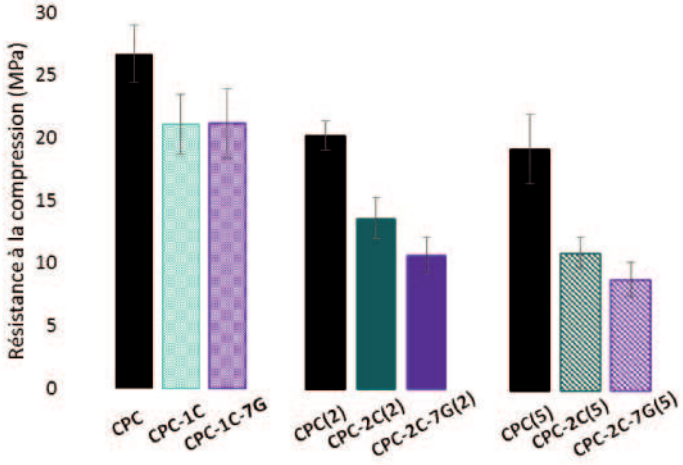


Figure 120 : Résistance à la compression des ciments contrôle (noir), chargé en caséine (turquoise) et chargé en caséine et en GaM (violet) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C

À l'image des résultats obtenus partie A et B, la différence entre les CPCs contrôles et ceux chargés doit provenir de ruptures préférentielles. Cette hypothèse sera vérifiée via les analyses de porosité et de MEB.

Les résultats des porosités mesurées par pycnométrie sont référencés dans le tableau 12 ci-après. La densité vraie obtenue des CPCs chargés en caséine et en GaM a diminué par rapport aux CPCs chargés seulement en caséine. Cette variation est due à l'augmentation de la proportion organique dans le ciment (de 10 % pour le CPC-1C-7G à 11 % pour les deux CPCs-2C-7G. Concernant la porosité, une légère augmentation de la porosité est observée pour les CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5). Néanmoins, à l'instar des résultats de porosité entre les CPCs contrôles et les CPCs chargés en caséine, la porosité des CPCs chargés en caséine et en GaM ne justifie pas la différence observée sur la résistance en compression.

Tableau 36 : Densité et porosité des différents ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline

	Na_2HPO_4 (%)	L/P	ρ_{vraie} (g/cm^3)	Porosité à 72 h (%)
CPC-1C	**0,5**	0,45	2,61	49,9
CPC-1C-7G	**0,5**	0,45	2,54	49,3
CPC-2C(2)	**2**	0,45	2,61	50,9
CPC-2C-7G(2)	**2**	0,45	2,56	52,6
CPC-2C(5)	**5**	0,45	2,68	50,3
CPC-2C-7G(5)	**5**	0,45	2,58	51,6

Dans le but d'étudier la microstructure de ces formulations, les CPCs ont été analysés par MEB (Figure 121). L'ajout de la caséine à 1 □ n'interfère pas la cristallogenèse des grains α-TCP du CPC-1C-7G, tandis que pour les CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) avec 2 % de caséine la microstructure est différente. Or nous avons vu d'après l'étude préliminaire (page 184) que la quantité de caséine n'affecte pas la formation des cristaux. De plus, il est visible sur les Figure 121 B et C que la taille des particules cristallisées est plus petite avec des cristaux aciculaires alors que sur la Figure 121 A il est possible d'observer davantage de plaques. Ce phénomène s'explique par le degré de sursaturation différent généré par la modification de la concentration en Na_2HPO_4. En effet, l'augmentation de la concentration en Na_2HPO_4 accélère la réaction de prise du CPC favorisant ainsi la formation des nombreux cristaux à la surface des grains d'α-TCP alors qu'une concentration plus faible encourage la croissance des cristaux. La formation de ces petits cristaux montre une porosité et une interconnexion des pores légèrement supérieure aux CPCs avec une solution de Na_2HPO_4 à 0,5 %, ce qui nuit à leur enchevêtrement

et donc aux propriétés mécaniques.[98] À l'image des résultats obtenus en résistance mécanique et en pycnométrie, les CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) sont similaires.

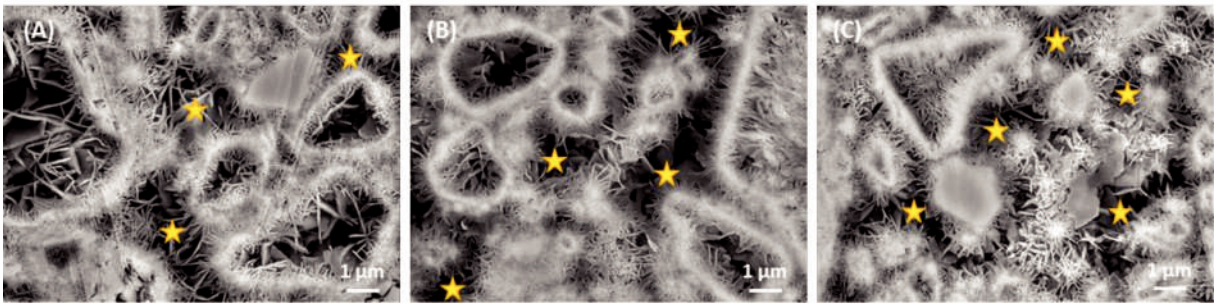


Figure 121 : Photographies MEB des ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à *37 °C dans une solution saline avec une préparation au crosspolisher, observation de l'inter*-grain à fort grandissement (★ inter-grain) avec (A) CPC-1C-7G, (B) CPC-2C-7G (2) et (C) CPC-2C-7G (5)

De plus, après la dissolution des pastilles de CPCs dans une solution de HCl à 5 %, le réseau de caséine a été observé pour chacune des formulations de CPCs, justifiant la favorisation de ruptures préférentielles au sein des CPCs.

Pour résumer, l'association de la caséine couplée au GaM dans le CPC induit des modifications plus marquées par rapport au CPC contrôle vis-à-vis des propriétés texturales du ciment allongeant le temps de prise ainsi que le temps d'injectabilité de pâte. La résistance mécanique est également impactée par la formation d'un « réseau » de caséine dans le CPC comme observé dans la partie B. Néanmoins la nature du produit final obtenue après la prise du ciment ainsi que la vitesse de réaction de prise ne sont pas altérées par l'association de ces différents composants.

3. Morphologie du maltolate de gallium au sein du ciment

Le CPC-1C-7G (Figure 122 A) montre une répartition bien homogène du GaM au sein des biomatériaux chargés en caséine. De plus, la morphologie des grains ne semble pas être altérée par cette incorporation dans le CPC ni par la caséine. En revanche, il est possible de remarquer un écart entre les cristaux de GaM et le CPC (Figure 122 B), alors que ces derniers étaient parfaitement intégrés dans le biomatériau sans caséine (Figure 86, page 162). Il est connu d'après les résultats de la porosité, que cette propriété n'est pas altérée par l'ajout de nos molécules, de ce fait, la mesure de ce vide provient de l'intercalation de caséine (non visible au MEB) entre les grains de GaM et le CPC.

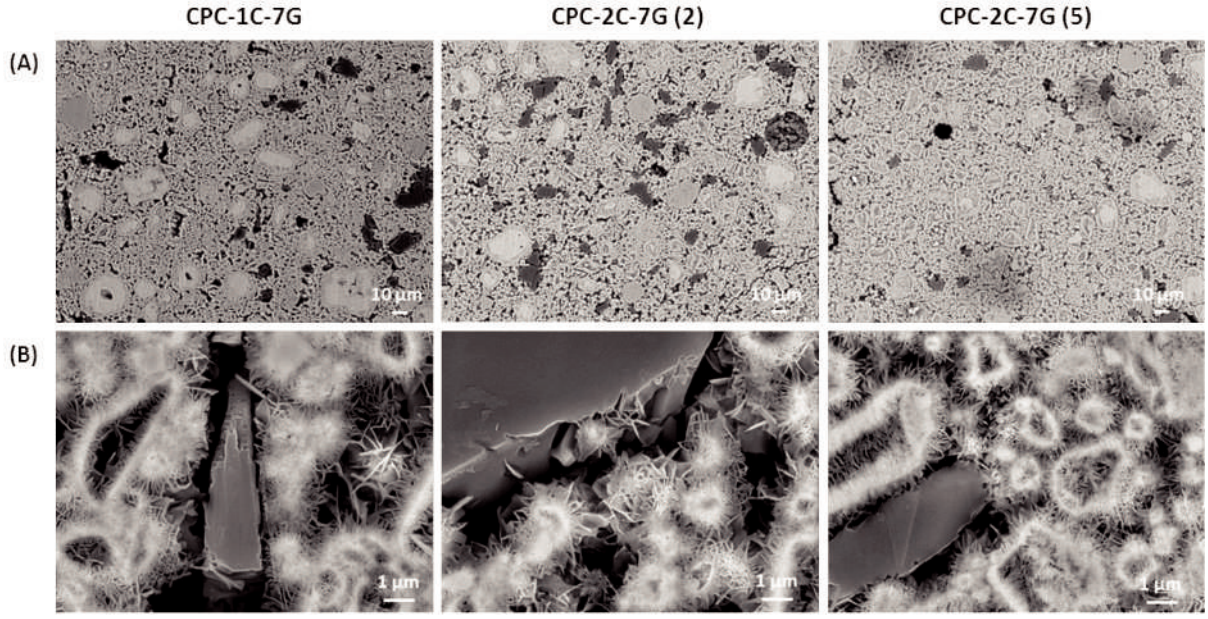


Figure 122 : Photographies MEB des ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec une préparation au crosspolisher, (A) observation de la répartition du GaM à faible grandissement, (B) observation du GaM à fort grandissement

L'étude de l'intégrité du GaM nécessiterait des analyses complémentaires comme de la RMN du solide ^{13}C ou ^{71}Ga.

4. Études de la libération du maltolate de gallium in vitro

Les pastilles de ciments dédiées à la libération ont été préparées selon le protocole décrit chapitre II page 72. Aucune modification n'a été apportée au protocole excepté le temps de séchage avant immersion qui est passé de 20 min à 30 min. Le gallium libéré a été étudié par spectroscopie AAS et le complexe GaM ainsi que le maltol par spectroscopie UV-visible.

4.1. Étude de la libération du maltolate de gallium

L'étude de la libération du gallium contenu dans le complexe par spectroscopie AAS a été réalisée selon les mêmes conditions décrites partie A page 166. Les courbes obtenues pour les CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) sont présentées ci-dessous sur la Figure 123. La courbe du CPC-7G de la partie A a également été intégrée en guise de référence pour un CPC sans caséine.

Il est possible d'observer entre les courbes CPC-7G et CPC-1C-7G que l'ajout de la caséine procure une libération plus rapide du gallium, c'est-à-dire qu'au niveau de la libération flash 34 ± 2 % du GaM est libéré par le CPC-1C-7G dans les 8 premières heures comparé au 28 ± 1 % pour le CPC-7G. Puis à la fin de la libération à 60 j, 64 ± 2 % de gallium a été libéré comparé au 58 ± 2 % du CPC-7G.

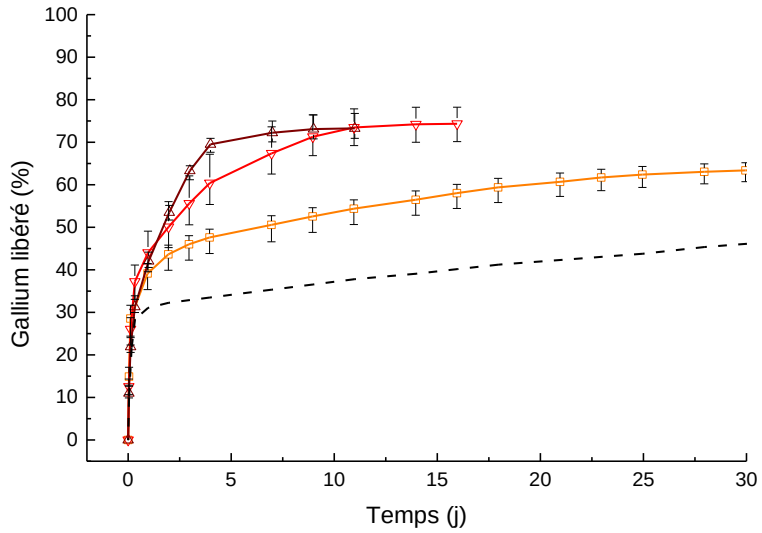


Figure 123 : Libération du gallium en fonction du temps pour les CPCs : CPC-1C-7G (orange), CPC-2C-7G(2) (rouge), CPC-2C-7G(5) (marron) et le CPC-7G (noir pointillé)

Concernant les CPCs combinés avec 2 % de caséine et ayant subi une modification de la concentration du liquide durcisseur : Na_2HPO_4 à 2 % pour le CPC-2C-7G(2) et Na_2HPO_4 à 5 % pour le CPC-2C-7G(5), la libération est également altérée par la taille des cristaux. En conséquence, plus la réaction de prise du CPC et rapide et plus la croissance des cristaux est faible ce qui, ainsi, augmente la vitesse de libération. Le gallium, dans les deux cas, est libéré au maximum à 74 ± 4 %, seulement cette libération est plus rapide pour le CPC-2C-7G(5) : 12 j par rapport à 16 j pour le CPC-2C-7G(2).

Les mesures UV ont ensuite été réalisées à partir des résultats d'AAS dans le but d'attester que le gallium libéré est sous la forme de maltolate de gallium. La dilution des solutions a été réalisée comme décrit partie A page 168, l'objectif étant d'obtenir un spectre UV caractéristique d'une solution de concentration en GaM de 25 ppm. Cette dernière permet d'éviter le phénomène de décomposition du complexe présent pour des concentrations plus faibles. Après décomposition des courbes obtenues, la libération obtenue du GaM par UV pour les CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) sont identiques et superposables à celles du gallium obtenues par AAS. À titre d'exemple, les courbes de libération du Ga et du GaM du CPC-2C-7G(5) sont présentées Figure 124 ci-dessous.

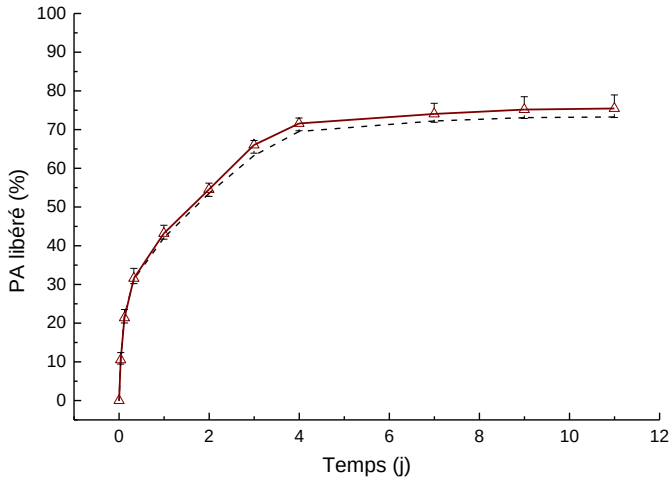


Figure 124 : Libération du gallium (pointillé noir) et du GaM (marron) en fonction du temps pour le CPC-2C-7G(5)

Tout comme les autres études de libération de cette thèse, les profils de libération ont été étudiés via les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-peppas. D'après le Tableau 37, le modèle d'Higuchi ne s'avère pas adapté pour décrire la libération des CPC-1C-7G et CPC-2C-7G(2) alors que le modèle de Korsmeyer-Peppas semble adéquat pour l'ensemble des libérations. Les valeurs de

n inférieure à 0,45 montrent que chaque système correspond à une diffusion de Fick. De plus, il est observable que les valeurs de n augmentent en fonction de la vitesse de libération.

Tableau 37 : Comparaison des profils de libération du Ga des CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	Équation	Paramètre	CPC-1C-7G	CPC-2C-7G(2)	CPC-2C-7G(5)
Higuchi	$Q(\%) = at^{0,5}$	r^2	0,3761	0,7705	0,9240
		a	17,15	35,03	41,77
Korsmeyer-peppas	$Q(\%) = kt^n$	r^2	0,9192	0,9342	0,9726
		k	35,63	42,70	43,60
		n	0,19	0,30	0,38

4.2. Étude de la libération du ligand maltol

La Figure 125 présente une partie agrandie de la libération afin d'observer correctement les différentes courbes de libération du ligand maltol libre pour les CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5). La courbe de la libération du maltol du CPC-7G de la partie A a également été intégrée en guise de référence pour un CPC sans caséine.

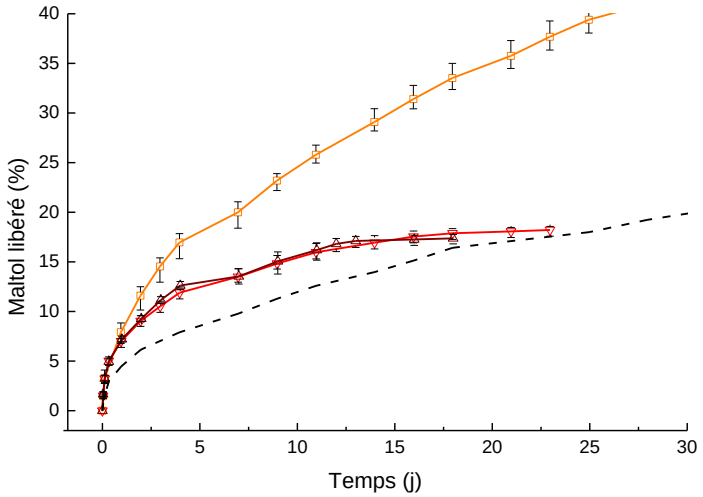


Figure 125 : Libération du maltol en fonction du temps pour les CPCs : CPC-1C-7G (orange), CPC-2C-7G(2) (rouge), CPC-2C-7G(5) (marron) et le CPC-7G (noir pointillé)

La libération du maltol du CPC-1C-7G est plus importante de celle du ciment contrôle sans caséine (CPC-7G). Par exemple à 4 j, le CPC-1C-7G a libéré 17 ± 2% de ligand comparé à 8 ± 1 % pour le CPC-7G. Admettant l'hypothèse que la dissociation du complexe n'est effectué que par les espèces ioniques du CPC et n'est pas dépendante de la quantité de caséine, cette

observation peut s'explique par le fait que l'ajout de la caséine induit seulement une augmentation de la cinétique de libération. En conséquence, la quantité de maltol mesurée par UV s'avère supérieure par rapport à la quantité libérée pour un ciment sans caséine.

Pour les CPCs combinés avec 2 % de caséine, les deux libérations des CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) sont semblables. Nous supposons que deux phénomènes entrent alors en jeu (i) la dissociation engendrée par le CPC et (ii) la microporosité induite par le changement de la phase liquide. Cette dernière provoque une libération rapide et en forte quantité du GaM dans le milieu ce qui limite ainsi la dissociation du complexe et donc la libération de maltol. La suite de la libération provient des interactions entre l'activité ionique et le GaM restant au sein du biomatériau.

Des analyses comme la RMN ^{71}Ga et ^{13}C du solide à différents temps de libération permettront d'apprécier l'environnement chimique du complexe et donc de répondre avec plus de précision sur l'analyse de ces cinétiques.

À l'image de la libération du maltol ligand du CPC-7G obtenue page 170 et d'après les modèles, les libérations sont soumises majoritairement à une diffusion de Fick (Tableau 38). Les deux modèles sont adéquats pour décrire cette libération. Concernant les valeurs de n du modèle de Korsmeyer-Peppas, ces dernières sont inférieures à 0,45 pour les CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5). La modélisation de la cinétique pour le CPC-1C-7G présente une valeur de n à 0,49 pouvant indiquer que la diffusion est également soumise au phénomène d'érosion.

Tableau 38 : Comparaison des profils de libération du Maltol des CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas

Modèle	**Équation**	**Paramètre**	**CPC-1C-7G**	**CPC-2C-7G(2)**	**CPC-2C-7G(5)**
Higuchi	$Q(\%) = at^{0,5}$	r^2	0,9192	0,9346	0,9780
		a	7,83	5,33	7,07
Korsmeyer-peppas	$Q(\%) = kt^n$	r^2	0,9956	0,9838	0,9919
		k	8,14	6,73	7,72
		n	0,49	0,39	0,41

5. Conclusions et perspectives

L'association à la fois de la caséine et du maltolate de gallium au sein du ciment commercial apatitique ne nuit pas à la formation de l'apatite. En revanche, concernant les propriétés texturales, nous savions que les deux composés altéraient ces dernières. De ce fait, la forte quantité en molécule organique (10 ou 11 □ en masse) a ralenti la prise du ciment et l'a rendu plus injectable et cohésif. Les propriétés structurales sont majoritairement modifiées (i) par la formation du réseau de caséine et (ii) par l'augmentation de la concentration en Na_2HPO_4 de la solution de durcisseur pour les ciments chargés à 2 % en caséine qui limite la croissance des cristaux. Après incorporation, la morphologie du maltolate de gallium semble inchangée. Des études de RMN ^{71}Ga et ^{13}C portant sur l'intégrité chimique du complexe sont en cours. Les études de libérations ont montré que l'incorporation de la caséine dans les ciments permet d'obtenir des cinétiques de libération différentes en fonction de la quantité de caséine. En effet plus la quantité de caséine est importante et plus la libération de maltolate de gallium est rapide et sa concentration inchangée. En outre, dans le cas des ciments chargés avec 2 % de caséine, la cinétique de libération est également affectée par la modification de la concentration en Na_2HPO_4 dans la phase liquide. En effet, cette limitation de la croissance des cristaux entraine une légère augmentation de la porosité qui permet à la molécule active de diffuser plus aisément. Les libérations présentées des trois formulations de ciments chargés en caséine et maltolate de gallium ont pu être modélisées par le modèle de Korsmeyer-Peppas indiquant que la libération suit la loi de diffusion de Fick. Pour compléter de ce travail de recherche, il serait nécessaire d'effectuer ces libérations dans un milieu plus acide permettant ainsi de mimer les conditions de pH utile à la résorption du biomatériau.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La douleur provoquée par le prélèvement du tissu osseux pour une chirurgie de reconstruction est considérée comme l'une des complications majeures lors d'une greffe autologue d'os.[4,12–16] L'analgésie multimodale est considérée comme la meilleure méthode pour limiter la douleur postopératoire et son évolution vers la chronicité.[20] En effet, cette technique comprend à la fois la réalisation de blocs nerveux périphériques par l'analgésie locorégionale et l'administration systémique de médicaments analgésiques.

Les CPCs injectables sont considérés comme des matériaux de référence pour de nouvelles approches thérapeutiques telles que les techniques percutanées ou mini-invasives.[4] Ces biomatériaux grâce à leur aptitude au moulage, peuvent parfaitement s'intégrer dans les sites d'implantation, optimisant ainsi le contact os-biomatériau dans des défauts osseux géométriquement complexes. De plus, une fois injectés, ces CPCs durcissent in situ grâce à une réaction peu exothermique contrairement aux ciments à base de PMMA. L'association de ces ciments osseux à des molécules bioactives a été étudiée pour améliorer les propriétés biologiques du biomatériau et apporter une réponse thérapeutique par la libération in situ de molécules actives pour des contextes cliniques délicats.[10,11] Dans cette étude, l'objectif était d'incorporer des anesthésiques locaux aux CPCs afin de les proposer comme candidats appropriés pour la gestion de la douleur après une chirurgie de reconstruction osseuse. De tels substituts osseux, pourront à la fois remplir le site de prélèvement et délivrer une substance analgésique in situ, ce qui constituerait une nouvelle approche thérapeutique.

Les études physico-chimiques des ciments chargés en anesthésiques locaux ont montré que les propriétés usuelles de ces ciments étaient que légèrement affectées par l'ajout des molécules actives. En effet, les analyses DRX, IRTF et RMN ^{31}P du solide ont permis de prouver que le produit final n'était pas altéré par l'ajout des antidouleurs. Les propriétés texturales telles que le temps de prise, l'injectabilité, la travaillabilité et la cohésion n'ont montré également aucune modification notable, comparées au ciment commercial. Seule la résistance mécanique a été altérée, par le biais de fracture préférentielle qu'engendrent les grains du PA, puisque la porosité et la microstructure sont restées inchangées par rapport au CPC non chargé.
Des études MEB et RMN ^{13}C du solide ont démontré qu'une fois associés au biomatériau les anesthésiques locaux gardaient leur intégrité ainsi que leurs propriétés chimiques respectives.
Dans l'optique d'une future utilisation clinique de ces biomatériaux, il est nécessaire de s'assurer de l'intégrité des composés après stérilisation. Les analyses SDM et RMN ^{1}H et ^{13}C

liquide ont alors permis de montrer que la structure chimique des molécules actives n'était pas modifiée post-irradiation gamma.

Les études de libération ont présenté des cinétiques différentes en fonction de l'anesthésique local intégré dans le biomatériau. Alors que les CPCs chargés en bupivacaïne et en ropivacaïne ont une cinétique de libération identique soit une libération totale en 15 jours, celui chargé en levobupivacaïne (l'énantiomère S de la bupivacaïne) possède une cinétique plus lente qui s'étend sur 28 jours. Cette différence provient du polymorphisme de la molécule qui engendre une modification de la solubilisation du composé au sein du biomatériau. L'étude d'un autre lot de levobupivacaïne, dont les analyses RMN ^{13}C et DRX montrent qu'il s'agit bien d'un polymorphe, a montré une libération de la molécule similaire à celles des CPCs chargés en bupivacaïne et ropivacaïne. Ainsi, ces ciments combinés permettent d'obtenir une libération contrôlée quelle que soit la molécule active incorporée dans le ciment. Les modélisations par les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas ont permis de montrer que le mécanisme de libération est induit par la diffusion de Fick. Cependant, il faut tenir compte du fait que les libérations ont été effectuées en milieu physiologique mais en l'absence de cellules osseuses, il sera important de prendre en compte le phénomène de remodelage osseux pouvant induire une érosion du biomatériau favorisant ainsi la libération des principes actifs.

L'influence des CPCs chargés en anesthésiques locaux sur la démarche postopératoire a ensuite été évaluée sur un modèle (rat) de douleur postopératoire par le système CatWalk^{TM} XT de Noldus. À notre connaissance, il semblerait que ce soit la première fois que ce système soit utilisé pour évaluer le soulagement de la douleur lié à l'implantation de substituts osseux. Cette méthode nous a permis de visualiser des différences significatives au niveau des effets analgésiques induits par ces biomatériaux chargés en molécules actives comparés au biomatériau contrôle non chargé. Ainsi, sur les 29 paramètres relatifs à l'analyse sur le membre opéré à 24 h postopératoires, 22 d'entre eux ont montré des différences significatives entre les CPCs chargés en anesthésiques locaux (bupivacaïne et ropivacaïne confondus) et le CPC contrôle comme les paramètres manual print length et duty cycle. En outre, 7 paramètres parmi ces derniers ont présenté des différences significatives entre le CPC chargé en bupivacaïne et celui chargé en ropivacaïne comme les paramètres print area et intensity présentés dans les résultats de cette thèse. La vitesse à laquelle l'animal exécute le mouvement est un paramètre important à considérer et peut créer des disparités et ce notamment sur les paramètres temporels. L'étude du membre opéré vis-à-vis du membre controlatéral non opéré a permis d'obtenir

davantage de significativité sur l'effet anesthésique des ciments implantés sur toute la durée postopératoire comme observé sur le paramètre stand. La coordination peut également être modifiée et étudiée via le système CatWalk. Pour finir, cette technique présente l'avantage d'être non traumatisante pour l'animal puisqu'elle minimise la préhension et donc le stress de ce dernier. En conséquence, ce type d'analyse est une méthode appropriée pour étudier la récupération fonctionnelle après l'injection d'un biomatériau chargé d'analgésique dans un défaut osseux. Malgré un large nombre de paramètres étudiés lors de ce travail de thèse, ce développement analytique peut encore être approfondi. Néanmoins, l'expérimentation animale aujourd'hui, est étroitement réglementée et d'un point de vue éthique une question reste en suspens. Peut-on aller plus loin sur le modèle animal et la problématique de la douleur ?
Les études in vivo sur la régénération osseuse ont montré que les formulations de CPCs chargés en molécules actives étaient bien tolérées que ce soit à 3 semaines ou 3 mois postopératoires.
Des études préliminaires in vitro sur le CPC chargé en bupivacaïne ont permis d'identifier des activités inhibitrices et bactéricides sur la flore présente lors de chirurgie osseuse (S. aureus et S. epidermidis) pour des solutions allant de 10^2 à 10^6 bactéries.mL^{-1}. En un mot, pour une quantité intégrable de bupivacaïne dans un ciment phosphocalcique, ce principe actif assure à la fois un rôle analgésique et anti-infectieux.

En conclusion, ces systèmes combinés en anesthésiques locaux prodiguent la libération contrôlée d'un anesthésique local durant plusieurs jours et jusqu'à 2 semaines ce qui leur permettrait d'être inclus dans un protocole d'analgésie multimodale dans le cadre d'un comblement de la crête iliaque lorsque cette dernière est utilisée comme site donneur lors d'une greffe osseuse autologue.

La dégénérescence du tissu osseux peut provenir à la fois du phénomène physiologique mais aussi de pathologies telles que l'ostéoporose ou les tumeurs ostéolytiques. Grâce au potentiel thérapeutique du gallium sur les maladies osseuses, plusieurs études successives ont été menées dans le but de concevoir des systèmes combinés avec ce composé.[23,24] Dans le but d'intégrer une quantité importante de gallium dans un ciment apatitique injectable, l'objectif de ce travail était de synthétiser un complexe de gallium, le maltolate de gallium, de l'intégrer à la formulation du CPC et de moduler sa libération.

Le complexe de maltolate de gallium, une fois synthétisé, a pu être associé dans la phase solide du ciment. Cette association n'a pas engendré de grands changements des propriétés usuelles

du ciment commercial, puisque seules les propriétés rhéologiques et mécaniques ont été modifiées rendant le biomatériau légèrement plus fragile mais plus injectable.

Les études de la cinétique de libération ont montré qu'il était possible de libérer du maltolate de gallium en condition physiologique. Ces dernières, grâce aux analyses combinées par AAS et UV-visible, ont mis en évidence une libération « flash » où environ 30 % du complexe est libéré durant les premières heures. Les modèles d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas n'ont pas permis de modéliser cette cinétique puisqu'elle résulte essentiellement du GaM situé au niveau de la partie externe du biomatériau. L'analyse UV a également montré que le GaM était libéré en simultané avec du ligand maltol libre. Ce dernier est libéré selon la diffusion de Fick. Ainsi, il existe donc une compétition entre le ligand maltol et les composés du ciment vis-à-vis du gallium. À l'heure actuelle, la nature chimique du gallium restant post-libération reste encore inconnue. Des études de RMN ^{71}Ga et ^{13}C sont en cours afin de déterminer cette dernière.

Les premières études in vitro sur le complexe GaM pur à 5 mg.mL^{-1} ont permis d'identifier des activités inhibitrices vis-à-vis des souches S. aureus et S. epidermidis pour des concentrations jusqu'à 10^6 bactéries.mL^{-1}. Les activités bactéricides ont été démontrées à 10^5 bactéries.mL^{-1} pour le S. epidermidis et à 10^3 bactéries.mL^{-1} pour le S. aureus. Néanmoins, lorsque le complexe est libéré par le CPC, ce dernier perd en activité antibactérienne et seule une activité inhibitrice a été observée sur le S. epidermidis. Ainsi, un effet dose du GaM combiné au CPC pourrait être étudié dans l'objectif d'intégrer un maximum de PA afin d'obtenir des propriétés biologiques optimales sans compromettre les propriétés physico-chimiques du biomatériau. De plus, les diverses activités thérapeutiques du gallium ont favorisé la synthèse de nouveaux complexes de gallium à partir de ligands organiques.[293] Ces derniers ont montré des propriétés prometteuses donnant accès notamment à de nouvelles applications antitumorales. Il est alors possible d'envisager leur combinaison avec un CPC.

La caséine a été ajoutée au ciment dans le but de moduler la cinétique de libération du GaM. Cette association n'a pas modifié le produit final obtenu après la prise du ciment. Néanmoins, l'interaction entre la protéine et l'HPMC (contenu dans le CPC commercial) a engendré des modifications texturales et structurales rendant le CPC plus injectable, cohésif et fragile. Une optimisation de la concentration en Na_2HPO_4 de la phase liquide a donc été nécessaire afin de pouvoir augmenter la quantité de caséine intégrable. Pour finir, la formation d'un réseau de caséine dans le CPC pourrait avoir un effet bénéfique sur la résorption osseuse, ce qui mériterait de réaliser une étude de la régénération osseuse in vivo.

L'intégrité de la caséine a également été analysée après stérilisation gamma. Ces études ont montré un impact des rayonnements sur la protéine. L'identification des radicaux formés est encore en cours, néanmoins les propriétés texturales du système combiné ne semblent pas être affectées.

La combinaison à la fois de la caséine et du GaM dans la phase solide du ciment n'a pas nui à la formation de l'apatite. Néanmoins, la forte quantité de molécules organiques (jusqu'à 11 %) a induit des modifications sur les propriétés texturales et structurales du ciment commercial. Pour chaque formulation, les temps de prise ont été allongés tandis que l'injectabilité et la cohésion ont augmenté. L'intégralité des propriétés structurales a été majoritairement modifiée (i) par la formation du réseau de caséine et (ii) par l'augmentation de la concentration en Na_2HPO_4 de la solution de durcisseur pour les ciments chargés à 2 % en caséine, ce qui a limité la croissance des cristaux.
La morphologie du GaM incorporé semble n'avoir pas été modifiée mais des études de RMN ^{71}Ga et ^{13}C concernant l'intégrité chimique du complexe sont en cours.
Les études de libération ont montré que plus le CPC contient de la caséine et plus la libération du GaM est importante et rapide. De plus, pour les CPCs combinés avec 2 % de caséine, la modification de la vitesse de prise a également affecté la cinétique de libération. Ceci s'explique par la taille des cristaux qui a diminué lorsque la concentration en Na_2HPO_4 est forte et permet ainsi à la molécule active de diffuser plus aisément via une augmentation de la microporosité. Ces libérations suivent toutes la loi de diffusion de Fick et ont été modélisées par le modèle de Korsmeyer-Peppas. De la même manière que pour les CPCs chargés en anesthésiques locaux, il serait intéressant d'étudier ces libérations dans un milieu plus acide permettant ainsi de mimer les conditions de pH utile à la résorption du biomatériau.

Au bilan, au cours de cette thèse, nous avons réussi, à partir d'un système commercial de CPCs à incorporer des molécules actives aux propriétés biologiques conservées sans compromettre le substitut osseux, ce qui ouvre de grandes perspectives pré-cliniques et cliniques.

Références bibliographiques

1. Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. Injury **36 Suppl 3,** S20-27 (2005).
2. Goz, V. et al. Vertebroplasty and kyphoplasty: national outcomes and trends in utilization from 2005 through 2010. Spine J **15,** 959–965 (2015).
3. Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E. & Horch, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J. Cell. Mol. Med. **10,** 7–19 (2006).
4. Maharaj, M. M., Phan, K. & Mobbs, R. J. Anterior cervical discectomy and fusion (ACDF) autograft versus graft substitutes: what do patients prefer?—A clinical study. Journal of Spine Surgery **2,** 105–110 (2016).
5. Sasso, R. C., LeHuec, J. C., 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 **18 Suppl,** S77-81 (2005).
6. Legeros, R., Chohayeb, A. & Shulman, A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. Journal of Dental Research **61,** 343 (1982).
7. Brown, W. & Chow, L. A New Calcium-Phosphate Setting Cement. J. Dent. Res. **62,** 672–672 (1983).
8. Bohner, M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. Eur Cell Mater **20,** 1–12 (2010).
9. Bohner, M. & Baroud, G. Injectability of calcium phosphate pastes. Biomaterials **26,** 1553–1563 (2005).
10. Ginebra, M. P., Traykova, T. & Planell, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. Journal of Controlled Release **113,** 102–110 (2006).
11. Ginebra, M.-P., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D. & Montufar, E. B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. Advanced Drug Delivery Reviews **64,** 1090–1110 (2012).
12. Silber, J. S. et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. Spine **28,** 134–139 (2003).
13. Zaslansky, R. et al. Early administration of oral morphine to orthopedic patients after surgery. J Opioid Manag **2,** 88–92 (2006).
14. Chung, F., Ritchie, E. & Su, J. Postoperative pain in ambulatory surgery. Anesth. Analg. **85,** 808–816 (1997).
15. Pollock, R. et al. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. European Spine Journal **17,** 845–852 (2008).
16. Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. & Greenfield, M. L. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. Clin. Orthop. Relat. Res. 76–81 (1997).
17. Samartzis, D. et al. Efficacy of Postoperative Pain Management Using Continuous Local Anesthetic Infusion at the Iliac Crest Bone Graft Site in Patients with Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Parallel, Double-Blinded, Randomized Controlled Pilot Trial. Global Spine Journal **6,** 220–228 (2016).
18. Schwartz, C. E. et al. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. Health and Quality of Life Outcomes **7,** 49 (2009).
19. O'Neill, K. R., Lockney, D. T., Bible, J. E., Crosby, C. G. & Devin, C. J. Bupivacaine for Pain Reduction After Iliac Crest Bone Graft Harvest. Orthopedics **37,** e428–e434 (2014).

20. White, P. F. Multimodal analgesia: its role in preventing postoperative pain. Curr Opin Investig Drugs **9,** 76–82 (2008).
21. Jin, F. & Chung, F. Multimodal analgesia for postoperative pain control. J Clin Anesth **13,** 524–539 (2001).
22. Aubrun, F. Approche multimodale de l'analgésie. (2013).
23. Mellier, C. et al. Design and properties of novel gallium-doped injectable apatitic cements. Acta Biomaterialia **24,** 322–332 (2015).
24. Strazic-Geljic, I. et al. Gallium, a promising candidate to disrupt the vicious cycle driving osteolytic metastases. Biochemical Pharmacology **116,** 11–21 (2016).
25. Loveridge, N. Bone: more than a stick. J Anim Sci **77(Suppl 2),** 190–196 (1999).
26. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol **3 Suppl 3,** S131-139 (2008).
27. Currey, J. D. The structure and mechanics of bone. J Mater Sci **47,** 41–54 (2012).
28. Legros, R., Balmain, N. & Bonel, G. Structure and Composition of the Mineral Phase of Periosteal Bone. J. Chem. Res.-S 8–9 (1986).
29. Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I. R. & Glimcher, M. J. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. Calcif. Tissue Int. **45,** 157–164 (1989).
30. Kuhn, L. T. et al. A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. Calcif. Tissue Int. **83,** 146–154 (2008).
31. Rey, C., Combes, C., Drouet, C. & Glimcher, M. J. Bone mineral: update on chemical composition and structure. Osteoporos Int **20,** 1013–1021 (2009).
32. De Vernejoul, M. C. & Marie. Cellules osseuses et remodelage osseux. médecine/sciences **9,** 1192–1203 (1993).
33. Pape, H. C., Evans, A. & Kobbe, P. Autologous bone graft: properties and techniques. J Orthop Trauma **24 Suppl 1,** S36-40 (2010).
34. Delloye, C., Cornu, O., Druez, V. & Barbier, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. J Bone Joint Surg Br **89,** 574–579 (2007).
35. Calvo, R., Figueroa, D., Díaz-Ledezma, C., Vaisman, A. & Figueroa, F. Bone allografts and the functions of bone banks. Rev Med Chil **139,** 660–666 (2011).
36. Shegarfi, H. & Reikeras, O. Review article: bone transplantation and immune response. J Orthop Surg (Hong Kong) **17,** 206–211 (2009).
37. Board, T. N., Rooney, P., Kearney, J. N. & Kay, P. R. Impaction allografting in revision total hip replacement. The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **88-B,** 852–857 (2006).
38. Tomford, W. W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. J Bone Joint Surg Am **77,** 1742–1754 (1995).
39. Marcus, R., Kay, K. & Mann, J. M. Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in health-care settings worldwide. Bull World Health Organ **67,** 577–582 (1989).
40. Conseil Supérieur de la Santé. Inactivation et sécurisation des tissus et des cellules vis-à-vis des bactéries, des virus ou des prions - Partie III virologie. (2012).
41. Colat-Parros, J. & Jordana, F. Les substituts osseux. 10 (2010).
42. Heughebaert, J. C., Zawacki, S. J. & Nancollas, G. H. The growth of nonstoichiometric apatite from aqueous solution at 37°C: I. Methology and growth at pH 7.4. Journal of Colloid and Interface Science **135,** 20–32 (1990).
43. Bohner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury **31,** D37–D47 (2000).
44. Fernández, E. et al. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. J Mater Sci Mater Med **10,** 169–176 (1999).

45. Pan, H.-B. & Darvell, B. W. Calcium Phosphate Solubility: The Need for Re-Evaluation. (2008). doi:10.1021/cg801118v
46. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates. Biomatter **1,** 121–164 (2011).
47. Vallet-Regí, M. & González-Calbet, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. Progress in Solid State Chemistry **32,** 1–31 (2004).
48. Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P. & Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials **19,** 133–139 (1998).
49. Rush, S. M. Bone graft substitutes: osteobiologics. Clin Podiatr Med Surg **22,** 619–630, viii (2005).
50. Bohner, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. Eur Spine J **10 Suppl 2,** S114-121 (2001).
51. Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M. & Planell, J. A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. Biomaterials **25,** 3453–3462 (2004).
52. Bohner, M., Gbureck, U. & Barralet, J. E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. Biomaterials **26,** 6423–6429 (2005).
53. Driessens, F. C., Planell, J. A., Boltong, M. G., Khairoun, I. & Ginebra, M. P. Osteotransductive bone cements. Proc Inst Mech Eng H **212,** 427–435 (1998).
54. Lemaitre, J., Mirtchi, A. A. & Mortier, A. Calcium phosphate cements for medical uses: state of the art and perspectives of development. Sil. Ind. Ceram. Sci. Technol. **52,** 141–146 (1987).
55. Grover, L. M., Hofmann, M. P., Gbureck, U., Kumarasami, B. & Barralet, J. E. Frozen delivery of brushite calcium phosphate cements. Acta Biomater **4,** 1916–1923 (2008).
56. Apelt, D. et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. Biomaterials **25,** 1439–1451 (2004).
57. Grover, L. M., Knowles, J. C., Fleming, G. J. P. & Barralet, J. E. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. Biomaterials **24,** 4133–4141 (2003).
58. Fernández, E. et al. The cement setting reaction in the CaHPO4-alpha-Ca3(PO4)2 system: an X-ray diffraction study. J. Biomed. Mater. Res. **42,** 403–406 (1998).
59. Barralet, J. E. et al. Cements from nanocrystalline hydroxyapatite. J Mater Sci Mater Med **15,** 407–411 (2004).
60. Bohner, M., Merkle, H. P., Landuyt, P. V., Trophardy, G. & Lemaitre, J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. Journal of Materials Science: Materials in Medicine **11,** 111–116 (2000).
61. Fernández, E. et al. Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. J. Biomed. Mater. Res. **32,** 367–374 (1996).
62. Liu, C., Shao, H., Chen, F. & Zheng, H. Effects of the granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement. Biomaterials **24,** 4103–4113 (2003).
63. Schnitzler, V. Système combiné Bisphosphonate / ciment apatitique : un matériau innovant actif contre les dérèglements de la résorption osseuse. (École doctorale Matériaux, Matières, Molécules en Pays de la Loire, 2009).
64. ASTM C226-08. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. ASTM International (2008).
65. ASTM C191-04. Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Vicat needles. ASTM International (2004).
66. Fernández Enrique. Bioactive Bone Cements. Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering (2006). doi:10.1002/9780471740360.ebs1367

67. Bohner, M. Reactivity of calcium phosphate cements. J. Mater. Chem. **17,** 3980–3986 (2007).
68. Grover, L. M., Gbureck, U., Young, A. M., Wright, A. J. & Barralet, J. E. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β-TCP–pyrophosphoric acid bone cement. J. Mater. Chem. **15,** 4955–4962 (2005).
69. Hsu, H.-C., Tuan, W.-H. & Lee, H.-Y. In-situ observation on the transformation of calcium phosphate cement into hydroxyapatite. Materials Science and Engineering: C **29,** 950–954 (2009).
70. Hofmann, M. P., Young, A. M., Gbureck, U., Nazhat, S. N. & Barralet, J. E. FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: effect of intermediate phases. J. Mater. Chem. **16,** 3199–3206 (2006).
71. Schnitzler, V. et al. Investigation of alendronate-doped Apatitic Cements as a Potential Technology for the Prevention of Osteoporotic Hip Fractures: Critical Influence of the Drug Introduction Mode on the In Vitro Cement Properties. Acta Biomaterialia **7,** 759–770 (2011).
72. Mellier, C. et al. A straightforward approach to enhance the textural, mechanical and biological properties of injectable calcium phosphate apatitic cements (CPCs): CPC/blood composites, a comprehensive study. Acta Biomater **62,** 328–339 (2017).
73. Despas, C. et al. High-frequency impedance measurement as a relevant tool for monitoring the apatitic cement setting reaction. Acta Biomaterialia **10,** 940–950 (2014).
74. Hofmann, M. P., Nazhat, S. N., Gbureck, U. & Barralet, J. E. Real-time monitoring of the setting reaction of brushite-forming cement using isothermal differential scanning calorimetry. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **79,** 360–364 (2006).
75. Brunner, T. J., Grass, R. N., Bohner, M. & Stark, W. J. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction. J. Mater. Chem. **17,** 4072–4078 (2007).
76. Trtnik, G., Kavčič, F. & Turk, G. Prediction of concrete strength using ultrasonic pulse velocity and artificial neural networks. Ultrasonics **49,** 53–60 (2009).
77. Carlson, J., Nilsson, M., Fernández, E. & Planell, J. A. An ultrasonic pulse-echo technique for monitoring the setting of CaSO4-based bone cement. Biomaterials **24,** 71–77 (2003).
78. Khairoun, I., Boltong, M. G., Driessens, F. C. M. & Planell, J. A. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. Journal of Materials Science: Materials in Medicine **9,** 425–428 (1998).
79. Goncalves, S. *Élaboration d'un ciment phosphocalcique injectable : études* physico-chimique, galénique et de biocompatibilité. (Toulouse, INPT, 2001).
80. Habib, M., Baroud, G., Galea, L. & Bohner, M. Evaluation of the ultrasonication process for injectability of hydraulic calcium phosphate pastes. Acta Biomater **8,** 1164–1168 (2012).
81. Wang, X., Chen, L., Xiang, H. & Ye, J. Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **81,** 410–418 (2007).
82. Liu, W., Zhang, J., Weiss, P., Tancret, F. & Bouler, J. M. The influence of different cellulose ethers on both the handling and mechanical properties of calcium phosphate cements for bone substitution. Acta Biomater **9,** 5740–5750 (2013).
83. Burguera, E. F., Xu, H. H. K. & Weir, M. D. Injectable and rapid-setting calcium phosphate bone cement with dicalcium phosphate dihydrate. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **77,** 126–134 (2006).
84. Burguera, E. F., Xu, H. H. K. & Sun, L. Injectable Calcium Phosphate Cement: Effects of Powder-to-Liquid Ratio and Needle Size. J Biomed Mater Res B Appl Biomater **84,** 493–502 (2008).

85. Ishikawa, K. Effects of spherical tetracalcium phosphate on injectability and basic properties of apatitic cement. Int Conf on Met and Semicond Glasses (MSG-86), International Conference on Metallic and Semiconducting Glasses (MSG-86)., Key Eng Mat, Key Eng Mater, pt 2 and pt 3 1987, Int Conf on Met and Semicond Glasses (MSG-86) **240–242,** 369–372 (2003).
86. Khairoun, I., Driessens, F. C., Boltong, M. G., Planell, J. A. & Wenz, R. Addition of cohesion promotors to calcium phosphate cements. Biomaterials **20,** 393–398 (1999).
87. Liu, H. et al. Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. Acta Biomaterialia **2,** 557–565 (2006).
88. Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Kon, M., Nagayama, M. & Asaoka, K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. Biomaterials **16,** 527–532 (1995).
89. Alkhraisat, M. H. et al. The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion. Acta Biomater **5,** 3150–3156 (2009).
90. Habraken, W. J. E. M. et al. Introduction of enzymatically degradable poly(trimethylene carbonate) microspheres into an injectable calcium phosphate cement. Biomaterials **29,** 2464–2476 (2008).
91. Xu, H. H. K. & Simon, C. G. Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: reinforcement, macropores, and cell response. J Biomed Mater Res A **69,** 267–278 (2004).
92. Ginebra Maria-Pau et al. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. Journal of Biomedical Materials Research Part A **80A,** 351–361 (2006).
93. Almirall, A. et al. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. Biomaterials **25,** 3671–3680 (2004).
94. Barralet, J. E., Grover, L., Gaunt, T., Wright, A. J. & Gibson, I. R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. Biomaterials **23,** 3063–3072 (2002).
95. Tang, M., Weir, M. D. & Xu, H. H. K. Mannitol-containing macroporous calcium phosphate cement encapsulating human umbilical cord stem cells. J Tissue Eng Regen Med **6,** 214–224 (2012).
96. Xu, H. H. K., Carey, L. E. & Simon, C. G. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. J Mater Sci: Mater Med **18,** 1345–1353 (2007).
97. Hesaraki, S., Moztarzadeh, F. & Sharifi, D. Formation of interconnected macropores in apatitic calcium phosphate bone cement with the use of an effervescent additive. J Biomed Mater Res A **83,** 80–87 (2007).
98. Espanol, M. et al. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. Acta Biomater **5,** 2752–2762 (2009).
99. FernÁndez, E. et al. Dimensional and thermal behaviour of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. Journal of Materials Science Letters **14,** 4–5 (1995).
100. Charrière, E. et al. Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. Biomaterials **22,** 2937–2945 (2001).
101. Charriere, E., Lemaitre, J. & Zysset, P. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. Biomaterials **24,** 809–817 (2003).
102. Keating, J. F., Hajducka, C. L. & Harper, J. Minimal internal fixation and calcium-phosphate cement in the treatment of fractures of the tibial plateau. A pilot study. J Bone Joint Surg Br **85,** 68–73 (2003).
103. Goodman, S. B. et al. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results. Clin. Orthop. Relat. Res. 42–50 (1998).

104. Niikura, T. et al. Antibiotic-impregnated calcium phosphate cement as part of a comprehensive treatment for patients with established orthopaedic infection. J. Orthop. Sci. **21,** 539–545 (2016).
105. Kammerlander, C. et al. The use of augmentation techniques in osteoporotic fracture fixation. Injury-Int. J. Care Inj. **47,** S36–S43 (2016).
106. Dusseldorp, J. R. & Mobbs, R. J. Iliac crest reconstruction to reduce donor-site morbidity: technical note. Eur. Spine J. **18,** 1386–1390 (2009).
107. Hoelzle, F. et al. Single-stage implantation in the atrophic alveolar ridge of the mandible with the Norian skeletal repair system. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. **49,** 542–545 (2011).
108. Xia, Y. et al. Injectable calcium phosphate scaffold with iron oxide nanoparticles to enhance osteogenesis via dental pulp stem cells. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 1–11 (2018). doi:10.1080/21691401.2018.1428813
109. Frederickson, A. M. & Sekula, R. F. The utility of calcium phosphate cement in cranioplasty following retromastoid craniectomy for cranial neuralgias. Br. J. Neurosurg. **27,** 808–811 (2013).
110. Park, Y. H., Kim, S. G., Lee, J. W. & Yoon, Y. H. Obliteration of temporal dorsal bulla in guinea pigs using different types of calcium phosphate. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. **75,** 1176–1180 (2011).
111. Kodera, T. et al. Evaluation of the Use of Calcium Phosphate Cement for Aesthetic Neurosurgical Cranial Reconstruction. World Neurosurg. **110,** E296–E304 (2018).
112. Robinson, Y., Heyde, C. E., Försth, P. & Olerud, C. Kyphoplasty in osteoporotic vertebral compression fractures - Guidelines and technical considerations. J Orthop Surg Res **6,** 43 (2011).
113. Al-Nakshabandi, N. A. Percutaneous vertebroplasty complications. Ann Saudi Med **31,** 294–297 (2011).
114. Marcia, S. et al. Effectiveness of a bone substitute (CERAMENT^{TM}) as an alternative to PMMA in percutaneous vertebroplasty: 1-year follow-up on clinical outcome. Eur Spine J **21,** 112–118 (2012).
115. Ferrec, M. L. et al. Design and properties of a novel radiopaque injectable apatitic calcium phosphate cement, suitable for image-guided implantation. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials (2017). doi:10.1002/jbm.b.34059
116. Rotter, R. et al. Biomechanical in vitro testing of human osteoporotic lumbar vertebrae following prophylactic kyphoplasty with different candidate materials. Spine **32,** 1400–1405 (2007).
117. Klein, R. et al. Osteointegration and Resorption of Intravertebral and Extravertebral Calcium Phosphate Cement. Clin. Spine Surg. **30,** E291–E296 (2017).
118. Korovessis, P., Hadjipavlou, A. & Repantis, T. Minimal invasive short posterior instrumentation plus balloon kyphoplasty with calcium phosphate for burst and severe compression lumbar fractures. Spine **33,** 658–667 (2008).
119. Liverneaux, P. & Khallouk, R. Calcium phosphate cement in wrist arthrodesis: three cases. J Orthop Sci **11,** 289–293 (2006).
120. Hirasawa, M., Mure, H., Toi, H. & Nagahiro, S. Surgical Results of Lumbar Interbody Fusion Using Calcium Phosphate Cement. Neurol Med Chir (Tokyo) **54,** 722–726 (2014).
121. Zhu, Z. et al. [Idiopathic thoracolumbar/lumbar scoliosis treated with anterior correction and interbody fusion with calcium phosphate cement]. Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery] **50,** 709–13 (2012).
122. Ooms, E. M., Wolke, J. G. C., van der Waerden, J. P. C. M. & Jansen, J. A. Use of injectable calcium-phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **66,** 447–456 (2003).

123. Ducic, Y. Titanium mesh and hydroxyapatite cement cranioplasty: a report of 20 cases. J. Oral Maxillofac. Surg. **60,** 272–276 (2002).
124. Alpantaki, K., Dohm, M., Korovessis, P. & Hadjipavlou, A. G. Surgical options for osteoporotic vertebral compression fractures complicated with spinal deformity and neurologic deficit. Injury-Int. J. Care Inj. **49,** 261–271 (2018).
125. Moore, D. C., Maitra, R. S., Farjo, L. A., Graziano, G. P. & Goldstein, S. A. Restoration of pedicle screw fixation with an in situ setting calcium phosphate cement. Spine **22,** 1696–1705 (1997).
126. Hartmann, S. et al. Cement-augmented screws in a cervical two-level corpectomy with anterior titanium mesh cage reconstruction: a biomechanical study. Eur. Spine J. **26,** 1047–1057 (2017).
127. Ginebra, M. P., Espanol, M., Montufar, E. B., Perez, R. A. & Mestres, G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. Acta Biomaterialia **6,** 2863–2873 (2010).
128. Ratier, A. et al. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. Biomaterials **22,** 897–901 (2001).
129. Bigi, A., Bracci, B. & Panzavolta, S. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. Biomaterials **25,** 2893–2899 (2004).
130. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. Journal of Pharmaceutical Sciences **52,** 1145–1149 (1993).
131. Suzuki, T. et al. Dissolution Tests for Self-Setting Calcium Phosphate Cement-Containing Nifedipine. 3 (2002).
132. Girod Fullana, S., Ternet, H., Freche, M., Lacout, J. L. & Rodriguez, F. Controlled release properties and final macroporosity of a pectin microspheres-calcium phosphate composite bone cement. Acta Biomater **6,** 2294–2300 (2010).
133. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. & Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. International Journal of Pharmaceutics **15,** 25–35 (1983).
134. Peppas, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. Pharm Acta Helv **60,** 110–111 (1985).
135. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. & Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Pol Pharm **67,** 217–223 (2010).
136. Siepmann, J. & Peppas, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Advanced Drug Delivery Reviews **48,** 139–157 (2001).
137. Tung, I.-C. In vitro drug release of antibiotic-loaded porous hydroxyapatite cement. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology **23,** 81–88 (1995).
138. Verron, E. et al. In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. Biomaterials **31,** 7776–7784 (2010).
139. Bohner, M., Lemaître, J., Merkle, H. P. & Gander, B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). J Pharm Sci **89,** 1262–1270 (2000).
140. Mcnally, A., Sly, K., Lin, S., Bourges, X. & Daculsi, G. Release of antibiotics from macroporous injectable calcium phosphate cement. Key Eng. Mater **361–363,** 359–362 (2008).
141. Obadia, L., Amador, G., Daculsi, G. & Bouler, J.-M. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. Biomaterials **24,** 1265–1270 (2003).

142. Ratier, A., Freche, M., Lacout, J. L. & Rodriguez, F. Behaviour of an injectable calcium phosphate cement with added tetracycline. Int J Pharm **274,** 261–268 (2004).
143. Stallmann, H. P., Faber, C., Bronckers, A. L. J. J., Amerongen, A. V. N. & Wuisman, P. I. J. M. Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing calcium phosphate cement. (2004).
144. Melicherčík, P., Nešuta, O. & Čeřovský, V. Antimicrobial Peptides for Topical Treatment of Osteomyelitis and Implant-Related Infections: Study in the Spongy Bone. Pharmaceuticals **11,** 20 (2018).
145. Ginebra, M. P. et al. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. J. Biomed. Mater. Res. **57,** 113–118 (2001).
146. Otsuka Makoto, Nakagawa Hidenori, Ito Atsuo & Higuchi William I. Effect of geometrical structure on drug release rate of a three-dimensionally perforated porous apatite/collagen composite cement. Journal of Pharmaceutical Sciences **99,** 286–292 (2009).
147. Verron, E. et al. Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. **94,** 89–96 (2010).
148. Irbe, Z., Loca, D., Vempere, D. & Berzina-Cimdina, L. Controlled release of local anesthetic from calcium phosphate bone cements. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **32,** 1690–1694 (2012).
149. Colpo, J. C., Pigatto, C., Brizuela, N., Aragón, J. & Santos, L. A. L. dos. Antibiotic and anesthetic drug release from double-setting α-TCP cements. J Mater Sci **53,** 7112–7124 (2018).
150. Tani, T. et al. Doxorubicin-loaded calcium phosphate cement in the management of bone and soft tissue tumors. In Vivo **20,** 55–60 (2006).
151. Tanzawa, Y. et al. Potentiation of the antitumor effect of calcium phosphate cement containing anticancer drug and caffeine on rat osteosarcoma. J Orthop Sci **16,** 77–84 (2011).
152. Verron, E. et al. Vertebroplasty using bisphosphonate-loaded calcium phosphate cement in a standardized vertebral body bone defect in an osteoporotic sheep model. Acta Biomaterialia **10,** 4887–4895 (2014).
153. Baek, J. et al. Incorporation of Calcium Sulfate Dihydrate into Hydroxyapatite Microspheres To Improve the Release of Bone Morphogenetic Protein-2 and Accelerate Bone Regeneration. ACS Biomater. Sci. Eng. **4,** 846–856 (2018).
154. Shi, H., Zeng, S., Liu, X., Yu, T. & Zhou, C. Effects of strontium doping on the degradation and Sr ion release behaviors of -tricalcium phosphate bone cement. J. Am. Ceram. Soc. **101,** 502–508 (2018).
155. Alkhraisat, M. H. et al. Strontium modified biocements with zero order release kinetics. Biomaterials **29,** 4691–4697 (2008).
156. Zhou, Y. et al. Fast setting tricalcium silicate/magnesium phosphate premixed cement for root canal filling. Ceram. Int. **44,** 3015–3023 (2018).
157. Kanter, B. et al. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. Acta Biomater. **69,** 352–361 (2018).
158. Bernhardt, A., Schamel, M., Gbureck, U. & Gelinsky, M. Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co2+, Cu2+ and Cr3+ incorporated into calcium phosphate bone cements. PLoS One **12,** e0182109 (2017).
159. Rentsch, B. et al. Trivalent chromium incorporated in a crystalline calcium phosphate matrix accelerates materials degradation and bone formation in vivo. Acta Biomater. **69,** 332–341 (2018).

160. Jacquart, S. et al. Composition and properties of silver-containing calcium carbonate–calcium phosphate bone cement. Journal of Materials Science: Materials in Medicine **24,** 2665–2675 (2013).
161. Wilder-Smith, O. H. & Arendt-Nielsen, L. Postoperative HyperalgesiaIts Clinical Importance and Relevance. The Journal of the American Society of Anesthesiologists **104,** 601–607 (2006).
162. Rasche, S. & Koch, T. Regional anaesthesia versus general anaesthesia--pathophysiology and clinical implications. Anaesthesiol Reanim **29,** 30–38 (2004).
163. Beaussier, M. Frequency, intensity, development and repercussions of postoperative pain as a function of the type of surgery. Ann Fr Anesth Reanim **17,** 471–493 (1998).
164. Schobelock, M. J. Pain management: engineering successful outcomes. J Healthc Mater Manage **10,** 61–66 (1992).
165. Smith, G. Pain after surgery. Br J Anaesth **67,** 233–234 (1991).
166. SFAP, SFETD & SFAR. Douleur, soins palliatifs et accompagnement. (Med-Line Editions, 2016).
167. Osinski, T., Lallemant, A. & Russo, T. Modulation et dérèglements neurophysiologiques des voies de la douleur. Kinésithérapie, la Revue **17,** 16–32 (2017).
168. Chauvin, M. Hyperalgésie : Quelle est la prévention, et quel est son impact clinique ? (2013).
169. Santy, J. & Mackintosh, C. A phenomenological study of pain following fractured shaft of femur. Journal of Clinical Nursing **10,** 521–527
170. Sabsovich, I. et al. Effect of anti-NGF antibodies in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. Pain **138,** 47–60 (2008).
171. Serre, C. M., Farlay, D., Delmas, P. D. & Chenu, C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. Bone **25,** 623–629 (1999).
172. Jimenez-Andrade, J. M. et al. The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain. Neurobiol Aging **33,** 921–932 (2012).
173. Rawashdeh, M. A. & Telfah, H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. Br J Oral Maxillofac Surg **46,** 665–670 (2008).
174. Joshi, A. & Kostakis, G. C. An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. British Dental Journal **196,** 167–171 (2004).
175. Karabulut, D. et al. Evaluation of Gait Characteristics of Patient Subjected to the Atrophic Jaw Augmentation. 8 (2015).
176. Summers, B. N. & Eisenstein, S. M. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. J Bone Joint Surg Br **71,** 677–680 (1989).
177. Myeroff, C. & Archdeacon, M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. J Bone Joint Surg Am **93,** 2227–2236 (2011).
178. Robertson, P. A. & Wray, A. C. Natural History of Posterior Iliac Crest Bone Graft Donation for Spinal Surgery: A Prospective Analysis of Morbidity. Spine **26,** 1473–1476 (2001).
179. Massart, R. et al. Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells. Scientific Reports **6,** 19615 (2016).
180. Kehlet, H., Jensen, T. S. & Woolf, C. J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. Lancet **367,** 1618–1625 (2006).
181. Ettrich, U., Seifert, J., Scharnagel, R. & Günther, K. P. [A multimodal and multidisciplinary postoperative pain management concept]. Orthopade **36,** 544, 546–551 (2007).
182. Scheiman, J. M. NSAID-induced Gastrointestinal Injury: A Focused Update for Clinicians. Journal of Clinical Gastroenterology **50,** 5–10 (2016).

183. Geusens, P., Emans, P. J., de Jong, J. J. A. & van den Bergh, J. NSAIDs and fracture healing: Current Opinion in Rheumatology **25,** 524–531 (2013).
184. Singh, K. et al. A prospective cohort analysis of adjacent vertebral body bone mineral density in lumbar surgery patients with or without instrumented posterolateral fusion: a 9- to 12-year follow-up. Spine **30,** 1750–1755 (2005).
185. Bigby, J., Reader, A., Nusstein, J., Beck, M. & Weaver, J. Articaine for supplemental intraosseous anesthesia in patients with irreversible pulpitis. J Endod **32,** 1044–1047 (2006).
186. Banks, A. Innovations in postoperative pain management: continuous infusion of local anesthetics. AORN J **85,** 904–914; quiz 915–918 (2007).
187. A Practical Approach to Regional Anesthesia, 4th Edition. | Anesthesiology | ASA Publications. Available at: http://anesthesiology.pubs.asahq.org/article.aspx?articleid=1924470. (Accessed: 24th May 2018)
188. *Lumb and Jones' Veter*inary Anesthesia and Analgesia. (Wiley-Blackwell, 2007).
189. Ruetsch, Y. A., Böni, T. & Borgeat, A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. Curr Top Med Chem **1,** 175–182 (2001).
190. Bader, A. M., Datta, S., Flanagan, H. & Covino, B. G. Comparison of Bupivacaine-and Ropivacaine-Induced Conduction Blockade in the Isolated Rabbit Vagus Nerve. Anesthesia & Analgesia **68,** 724 (1989).
191. Singh, A., Gupta, A., Datta, P. K. & Pandey, M. Intrathecal levobupivacaine versus bupivacaine for inguinal hernia surgery: a randomized controlled trial. Korean journal of anesthesiology (2018). doi:10.4097/kja.d.18.27191
192. Gentili, M., Monvoisin-Senlis, H., Bonnet, F. & A. R. Saint-Vincent, D. La bupivacaine peut elle remplacer la lidocaine en rachianesthesie ? (1999).
193. Åberg, G. Toxicological and Local Anaesthetic Effects of Optically Active Isomers of Two Local Anaesthetic Compounds. Acta Pharmacologica et Toxicologica **31,** 273–286 (1972).
194. Beaussier, M. La ropivacaïne en infiltration : pourquoi ? Le Praticien en Anesthésie Réanimation **8,** 9–12 (2004).
195. Johnson, S. M., Saint John, B. E. & Dine, A. P. Local anesthetics as antimicrobial agents: a review. Surg Infect (Larchmt) **9,** 205–213 (2008).
196. Rota, S. et al. Antibacterial Activity of Bupivacaine. Gazi Medical Journal **4,** (1993).
197. Adler, D. M. T., Damborg, P. & Verwilghen, D. R. The antimicrobial activity of bupivacaine, lidocaine and mepivacaine against equine pathogens: An investigation of 40 bacterial isolates. Vet. J. **223,** 27–31 (2017).
198. Dupleichs, M. et al. Delivery systems of local anesthetics in bone surgery: are they efficient and safe? Drug Discovery Today (2018). doi:10.1016/j.drudis.2018.06.019
199. Schmidt, B. et al. Local Pathology and Systemic Serum Bupivacaine After Subcutaneous Delivery of Slow-Releasing Bupivacaine Microspheres: Anesthesia & Analgesia **120,** 36–44 (2015).
200. Grillo, R. et al. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. Journal of Drug Targeting **18,** 688–699 (2010).
201. Qi, F. et al. Long-term effect of ropivacaine nanoparticles for sciatic nerve block on postoperative pain in rats. International Journal of Nanomedicine 2081 (2016). doi:10.2147/IJN.S101563
202. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. The 1st description of liposomes - A citation classic commentary on diffusion of univalent ions across the lamalae of swollen phospholipids. (1965).

203. McAlvin, J. B. et al. Multivesicular liposomal bupivacaine at the sciatic nerve. Biomaterials **35,** 4557–4564 (2014).
204. McAlvin, J. B. et al. Multivesicular liposomal bupivacaine at the sciatic nerve. Biomaterials **35,** 4557–4564 (2014).
205. Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M. & Järvinen, T. Cyclodextrins in drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery **2,** 335–351 (2005).
206. Serpe, L. et al. Anaesthetic efficacy of bupivacaine 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for dental anaesthesia after inferior alveolar nerve block in rats. Br J Oral Maxillofac Surg **52,** 452–457 (2014).
207. Martins, M. L. et al. Raman and Infrared spectroscopies and X-ray diffraction data on bupivacaine and ropivacaine complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. Data in brief **15,** 25–29 (2017).
208. de Araujo, D. R. et al. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. Eur J Pharm Sci **33,** 60–71 (2008).
209. Karashima, K. et al. Prolongation of Intrathecal and Sciatic Nerve Blocks Using a Complex of Levobupivacaine with Maltosyl-β-cyclodextrin in Rats. Anesthesia & Analgesia **104,** 1121–1128 (2007).
210. Rey, C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. Biomaterials **11,** 13–15 (1990).
211. Bajammal, S. S. et al. The Use of Calcium Phosphate Bone Cement in Fracture Treatment: A Meta-Analysis of Randomized Trials. The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume **90,** 1186–1196 (2008).
212. Russell, T. A. & Leighton, R. K. Comparison of Autogenous Bone Graft and Endothermic Calcium Phosphate Cement for Defect Augmentation in Tibial Plateau Fractures: A Multicenter, Prospective, Randomized Study. The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume **90,** 2057–2061 (2008).
213. Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O. & Verron, E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. Acta Biomaterialia **53,** 1–12 (2017).
214. Verron, E., Khairoun, I., Guicheux, J. & Bouler, J.-M. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. Drug Discov. Today **15,** 547–552 (2010).
215. Verron, E., Bouler, J. M. & Guicheux, J. Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs. Acta Biomater **8,** 3541–3551 (2012).
216. Colpo, J., PIgatto, C., Aragon, J. & Dos Santos, L. Antibiotic and anesthetic drug release from doubler-setting TCP cements. J Mater Sci: Biomaterials (2018).
217. Zhang, J., Liu, W., Schnitzler, V., Tancret, F. & Bouler, J.-M. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. Acta Biomaterialia **10,** 1035–1049 (2014).
218. Thiebaut, J. M., Roussy, G., Chlihi, K. & Bessiere, J. Dielectric study of the activation of blende with cupric ions. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry **262,** 131–144 (1989).
219. Ginebra, M. P. Calcium phosphate bone cements. in Orthopaedic Bone Cements 206–230 (Elsevier, 2008). doi:10.1533/9781845695170.2.206
220. Metz, G., Wu, X. L. & Smith, S. O. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. Journal of Magnetic Resonance, Series A **110,** 219–227 (1994).
221. Noukrati, H. et al. Injectability, microstructure and release properties of sodium fusidate-loaded apatitic cement as a local drug-delivery system. Materials Science and Engineering: C **59,** 177–184 (2016).

222. Noukrati, H. Etude physicochimique de l'association d'un antibiotique avec un ciment apatitique pour la substitution osseuse. Available at: http://www.theses.fr/188277374. (Accessed: 16th June 2018)
223. Schmidt, A. C. The Role of Molecular Structure in the Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs: Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs, Part X. Pharm Res **22,** 2121–2133 (2005).
224. Giron, D., Draghi, M., Goldbronn, C., Pfeffer, S. & Piechon, P. Study of the polymorphic behaviour of some local anesthetic drugs. Journal of Thermal Analysis **49,** 913–927 (1997).
225. Niederwanger, V., Gozzo, F. & Griesser, U. J. Characterization of Four Crystal Polymorphs and a Monohydrate of S-Bupivacaine Hydrochloride (Levobupivacaine Hydrochloride). Journal of Pharmaceutical Sciences **98,** 1064–1074 (2009).
226. Panagopoulou-Kaplani, A. & Malamataris, S. Preparation and characterisation of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. Int J Pharm **195,** 239–246 (2000).
227. Aguiar, A. J., Krc, J., Kinkel, A. W. & Samyn, J. C. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. J Pharm Sci **56,** 847–853 (1967).
228. Chemburkar, S. R. et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. Organic Process Research and Development **4,** 413–417 (2000).
229. Hamaed, H. et al. Application of solid-state 35Cl NMR to the structural characterization of hydrochloride pharmaceuticals and their polymorphs. J. Am. Chem. Soc. **130,** 11056–11065 (2008).
230. Lubach, J. W. et al. Solid-state NMR studies of pharmaceutical solids in polymer matrices. Anal Bioanal Chem **378,** 1504–1510 (2004).
231. Poole, R. et al. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. Osteoarthr. Cartil. **18 Suppl 3,** S10-16 (2010).
232. Russell, W. M. S. & Burch, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. UFAW (1959).
233. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain **16,** 109–110 (1983).
234. Jones, L. E. First Steps: The Early Years of IASP, 1973-1984. IASP Press. Seattle **24,** (2010).
235. Organisation mondiale de la santé animale. Évaluation scientifique et gestion de la douleur animale. **10,** (2009).
236. Morton, D. B. & Griffiths, P. H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. Vet. Rec. **116,** 431–436 (1985).
237. Flecknell, P. A. Refinement of animal use - Assessment and alleviation of pain and distress. Lab. Anim. **28,** 222–231 (1994).
238. Flecknell, P. A. & Roughan, J. V. Assessing pain in animals - Putting research into practice. Animal Welfare **13,** 71–75 (2004).
239. Gregory, N. S. et al. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. The Journal of Pain **14,** 1255–1269 (2013).
240. Piel, M. J., Kroin, J. S., van Wijnen, A. J., Kc, R. & Im, H.-J. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. Gene **537,** 184–188 (2014).
241. Möller, K. A., Johansson, B. & Berge, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. J. Neurosci. Methods **84,** 41–47 (1998).
242. Beecher, H. K. The measurement of pain; prototype for the quantitative study of subjective responses. Pharmacol. Rev. **9,** 59–209 (1957).

243. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. (National Academies Press (US), 2009).
244. O'Connell, P. G., Lohmann Siegel, K., Kepple, T. M., Stanhope, S. J. & Gerber, L. H. Forefoot deformity, pain, and mobility in rheumatoid and nonarthritic subjects. J. Rheumatol. **25,** 1681–1686 (1998).
245. Mündermann, A., Dyrby, C. O. & Andriacchi, T. P. Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: increased load at the ankle, knee, and hip during walking. Arthritis Rheum. **52,** 2835–2844 (2005).
246. Baker, R. The history of gait analysis before the advent of modern computers. Gait Posture **26,** 331–342 (2007).
247. Boettger, M. K. et al. Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis: Pain **145,** 142–150 (2009).
248. Dorman, C. W., Krug, H. E., Frizelle, S. P., Funkenbusch, S. & Mahowald, M. L. A comparison of DigiGait™ and TreadScan™ imaging systems: assessment of pain using gait analysis in murine monoarthritis. J Pain Res **7,** 25–35 (2014).
249. Pereira, J. E. et al. A comparison analysis of hindlimb kinematics during overground and treadmill locomotion in rats. Behavioural Brain Research **172,** 212–218 (2006).
250. Niederschuh, S. J., Helbig, T., Zimmermann, K., Witte, H. & Schmidt, M. Kinematic response in limb and body posture to sensory feedback from carpal sinus hairs in the rat (Rattus norvegicus). Zoology **121,** 18–34 (2017).
251. Koopmans, G. C. et al. Strain and locomotor speed affect over-ground locomotion in intact rats. Physiology & Behavior **92,** 993–1001 (2007).
252. Vrinten, D. H. & Hamers, F. F. 'CatWalk'automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. Pain **102,** 203–209 (2003).
253. Coulthard, P., Pleuvry, B. J., Brewster, M., Wilson, K. L. & Macfarlane, T. V. Gait analysis as an objective measure in a chronic pain model. Journal of neuroscience methods **116,** 197–213 (2002).
254. Vandeputte, C. et al. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. BMC neuroscience **11,** 1 (2010).
255. Miyagi, M. et al. Assessment of Gait in a Rat Model of Myofascial Inflammation Using the CatWalk System: Spine **36,** 1760–1764 (2011).
256. Chen, Y.-J. et al. Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. Journal of neuroengineering and rehabilitation **11,** 1 (2014).
257. Deumens, R., Jaken, R. J. P., Marcus, M. A. E. & Joosten, E. A. J. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. Journal of Neuroscience Methods **164,** 120–130 (2007).
258. Ferland, C. E., Laverty, S., Beaudry, F. & Vachon, P. Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. Pharmacology Biochemistry and Behavior **97,** 603–610 (2011).
259. Möller, K. Ä., Berge, O.-G. & Hamers, F. P. T. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. Journal of Neuroscience Methods **174,** 1–9 (2008).
260. Gabriel, A. F., Marcus, M. A. E., Honig, W. M. M., Walenkamp, G. H. I. M. & Joosten, E. A. J. The CatWalk method: A detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. Journal of Neuroscience Methods **163,** 9–16 (2007).
261. Favreau, L. Modélisation du mouvement des quadrupèdes à partir de la vidéo. (2009).

262. Casati, A. & Putzu, M. Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? Best Pract Res Clin Anaesthesiol **19,** 247–268 (2005).
263. Batka, R. J. et al. The Need for Speed in Rodent Locomotion Analyses: The Need for Speed. The Anatomical Record **297,** 1839–1864 (2014).
264. Hoffmann, M. H. et al. Gait changes precede overt arthritis and strongly correlate with symptoms and histopathological events in pristane-induced arthritis. Arthritis research & therapy **12,** 1 (2010).
265. Peter, B. et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. Bone **36,** 52–60 (2005).
266. Peter, B. et al. Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. J Biomed Mater Res A **76,** 133–143 (2006).
267. Basso, D. M., Beattie, M. S. & Bresnahan, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma **12,** 1–21 (1995).
268. Beyreuther, B., Callizot, N. & Stöhr, T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. Arthritis Res. Ther. **9,** R14 (2007).
269. Buerkle, H. et al. Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. Br J Anaesth **83,** 436–441 (1999).
270. Berryman, E. R., Harris, R. L., Moalli, M. & Bagi, C. M. Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. J Musculoskelet Neuronal Interact **9,** 89–98 (2009).
271. Curtin, L. I. et al. Evaluation of buprenorphine in a postoperative pain model in rats. Comp. Med. **59,** 60–71 (2009).
272. Fukui, D., Kawakami, M., Matsumoto, T. & Naiki, M. Stress enhances gait disturbance induced by lumbar disc degeneration in rat. Eur Spine J **27,** 205–213 (2018).
273. Karlov, A. V. et al. Adhesion of Staphylococcus Aureus to Implants with Different Physicochemical Characteristics. Bulletin of Experimental Biology and Medicine **134,** 277–280 (2002).
274. Rosenberg, P. H. & Renkonen, O. V. Antimicrobial activity of bupivacaine and morphine. Anesthesiology **62,** 178–179 (1985).
275. Hodson, M., Gajraj, R. & Scott, N. B. A comparison of the antibacterial activity of levobupivacaine vs. bupivacaine: an in vitro study with bacteria implicated in epidural infection: Forum. Anaesthesia **54,** 699–702 (1999).
276. Mueller, J. H. & Hinton, J. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **48,** 330–333 (1941).
277. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser **843,** 1–129 (1994).
278. Roux, C. et al. Traitement médicamenteux de l'ostéoporose post-ménopausique. La Presse Médicale **35,** 1529–1539 (2006).
279. IOF. Invest in your bones, Stand Tall, Speak Out, Take action to promote osteoporosis policy change. (2008).
280. IOF. Invest in your bones, quality of life, Why prevent the first fracture ? (2003).
281. Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., Johansson, H. & McCloskey, E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. Osteoporos Int **19,** 385–397 (2008).
282. HAS. Les médicaments de l'ostéoporose.

283. Coleman, R. E. et al. Advancing treatment for metastatic bone cancer: consensus recommendations from the Second Cambridge Conference. Clin. Cancer Res. **14,** 6387–6395 (2008).
284. Lafosse, J. tumeurs des os primitives et secondaires. 39
285. Quinn, R. H., Randall, R. L., Benevenia, J., Berven, S. H. & Raskin, K. A. Contemporary management of metastatic bone disease: tips and tools of the trade for general practitioners. Instr Course Lect **63,** 431–441 (2014).
286. Krzeszinski, J. Y. & Wan, Y. New therapeutic targets for cancer bone metastasis. Trends Pharmacol. Sci. **36,** 360–373 (2015).
287. Harris, W. R. & Pecoraro, V. L. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. Biochemistry **22,** 292–299 (1983).
288. Vallabhajosula, S. R., Harwig, J. F., Siemsen, J. K. & Wolf, W. Radiogallium localization in tumors: blood binding and transport and the role of transferrin. J. Nucl. Med. **21,** 650–656 (1980).
289. Bernstein, L. R. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. Pharmacol. Rev. **50,** 665–682 (1998).
290. Drobyski, W. R., Ul-Haq, R., Majewski, D. & Chitambar, C. R. Modulation of in vitro and in vivo T-cell responses by transferrin-gallium and gallium nitrate. Blood **88,** 3056–3064 (1996).
291. Levaditi, C., Bardet, J., Tchakirian, A. & Vaisman, A. Le gallium, propriétés thérapeutiques dans la syphilis et les trypano-somiases expérimentales. Compte Rendu de *l'Academie des Sciences* **192,** 1142–1143 (1931).
292. Foster, B. J., Clagett-Carr, K., Hoth, D. & Leyland-Jones, B. Gallium nitrate: the second metal with clinical activity. Cancer Treat Rep **70,** 1311–1319 (1986).
293. Chitambar, C. R. The therapeutic potential of iron-targeting gallium compounds in human disease: From basic research to clinical application. Pharmacol. Res. **115,** 56–64 (2017).
294. Collery, P., Millart, H. & Ferrand, O. Gallium chloride treatment of cancer patients after oral administration. A pilot study. Chemiotherapia **4,** 1165–1166 (1985).
295. Collery, P. et al. Clinical pharmacology of gallium chloride after oral administration in lung cancer patients. Anticancer Res. **9,** 353–356 (1989).
296. Bernstein, L. R., Tanner, T., Godfrey, C. & Noll, B. Chemistry and Pharmacokinetics of Gallium Maltolate, a Compound With High Oral Gallium Bioavailability. Met Based Drugs **7,** 33–47 (2000).
297. Pribisko, M. et al. Cellular uptake and anticancer activity of carboxylated gallium corroles. PNAS **113,** E2258–E2266 (2016).
298. Arivett, B. A. et al. Antimicrobial Activity of Gallium Protoporphyrin IX against Acinetobacter baumannii Strains Displaying Different Antibiotic Resistance Phenotypes. Antimicrob. Agents Chemother. **59,** 7657–7665 (2015).
299. Edwards, C. L. & Hayes, R. L. Tumor scanning with 67Ga citrate. J. Nucl. Med. **10,** 103–105 (1969).
300. Nelson, B., Hayes, R. L., Edwards, C. L., Kniseley, R. M. & Andrews, G. A. Distribution of gallium in human tissues after intravenous administration. J. Nucl. Med. **13,** 92–100 (1972).
301. Front, D. & Israel, O. The role of Ga-67 scintigraphy in evaluating the results of therapy of lymphoma patients. Semin Nucl Med **25,** 60–71 (1995).
302. Ortega, R., Suda, A. & Devès, G. Nuclear microprobe imaging of gallium nitrate in cancer cells. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **210,** 364–367 (2003).

303. Betoulle, S., C Etienne, J. & Vernet, G. Acute Immunotoxicity of Gallium to Carp (Cyprinus carpio L.). Bulletin of environmental contamination and toxicology **68,** 817–23 (2002).
304. Wu, X. et al. Gallium maltolate inhibits human cutaneous T-cell lymphoma tumor development in mice. J. Invest. Dermatol. **135,** 877–884 (2015).
305. Rangel-Vega, A., Bernstein, L. R., Mandujano-Tinoco, E. A., García-Contreras, S. J. & García-Contreras, R. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. Front Microbiol **6,** 282 (2015).
306. Emery, T. Exchange of iron by gallium in siderophores. Biochemistry **25,** 4629–4633 (1986).
307. Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., Imperi, F. & Visca, P. Pyochelin Potentiates the Inhibitory Activity of Gallium on Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother **58,** 5572–5575 (2014).
308. DeLeon, K. et al. Gallium Maltolate Treatment Eradicates Pseudomonas aeruginosa Infection in Thermally Injured Mice. Antimicrob. Agents Chemother. **53,** 1331–1337 (2009).
309. Olakanmi, O., Britigan, B. E. & Schlesinger, L. S. Gallium Disrupts Iron Metabolism of Mycobacteria Residing within Human Macrophages. Infect Immun **68,** 5619–5627 (2000).
310. Baldoni, D., Steinhuber, A., Zimmerli, W. & Trampuz, A. In Vitro Activity of Gallium Maltolate against Staphylococci in Logarithmic, Stationary, and Biofilm Growth Phases: Comparison of Conventional and Calorimetric Susceptibility Testing Methods. Antimicrob. Agents Chemother. **54,** 157–163 (2010).
311. Martens, R. J., Miller, N. A., Cohen, N. D., Harrington, J. R. & Bernstein, L. R. Chemoprophylactic Antimicrobial Activity of Gallium Maltolate against Intracellular Rhodococcus equi. Journal of Equine Veterinary Science **27,** 341–345 (2007).
312. Henriques, C. Pneumonia Therapy Developer Aridis Enrolling Patients in Pivotal Trial of Aerucin. Lung Disease News (2017).
313. Hall, S. W. et al. Kinetics of gallium nitrate, a new anticancer agent. Clin. Pharmacol. Ther. **25,** 82–87 (1979).
314. Baselga, J., Kris, M. G., Scher, H. I., Phillips, M. & Heelan, R. T. Phase II trial of gallium nitrate in previously treated patients with small cell lung cancer. Invest New Drugs **11,** 85–86 (1993).
315. Bedikian, A. Y. et al. Phase I clinical studies with gallium nitrate. Cancer Treat Rep **62,** 1449–1453 (1978).
316. Straus, D. J. Gallium nitrate in the treatment of lymphoma. Semin. Oncol. **30,** 25–33 (2003).
317. Chitambar, C. R. Gallium nitrate for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Expert Opin Investig Drugs **13,** 531–541 (2004).
318. Einhorn, L. Gallium nitrate in the treatment of bladder cancer. Semin. Oncol. **30,** 34–41 (2003).
319. Pro, B. et al. Phase 2 multicenter trial of gallium nitrate in patients with advanced non-Hodgkin's lymphoma (NHL). ASH Annual Meeting Abstracts **104,** (2004).
320. Chitambar, C. R., Purpi, D. P., Woodliff, J., Yang, M. & Wereley, J. P. Development of gallium compounds for treatment of lymphoma: gallium maltolate, a novel hydroxypyrone gallium compound, induces apoptosis and circumvents lymphoma cell resistance to gallium nitrate. J. Pharmacol. Exp. Ther. **322,** 1228–1236 (2007).
321. Warrell, R. P., Coonley, C. J., Straus, D. J. & Young, C. W. Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using gallium nitrate administered as a seven-day continuous infusion. Cancer **51,** 1982–1987

322. Bockman, R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. Semin. Oncol. **30,** 5–12 (2003).
323. Korbas, M., Rokita, E., Meyer-Klaucke, W. & Ryczek, J. Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite. J. Biol. Inorg. Chem. **9,** 67–76 (2004).
324. Bramlett, K., Onel, E., Viscusi, E. R. & Jones, K. A randomized, double-blind, dose-ranging study comparing wound infiltration of DepoFoam bupivacaine, an extended-release liposomal bupivacaine, to bupivacaine HCl for postsurgical analgesia in total knee arthroplasty. Knee **19,** 530–536 (2012).
325. Cvitkovic, F., Armand, J.-P., Tubiana-Hulin, M., Rossi, J.-F. & Warrell, R. P. Randomized, double-blind, phase II trial of gallium nitrate compared with pamidronate for acute control of cancer-related hypercalcemia. Cancer J **12,** 47–53 (2006).
326. Warrell, R. P., Murphy, W. K., Schulman, P., O'Dwyer, P. J. & Heller, G. A randomized double-blind study of gallium nitrate compared with etidronate for acute control of cancer-related hypercalcemia. J. Clin. Oncol. **9,** 1467–1475 (1991).
327. Warrell, R. P., Skelos, A., Alcock, N. W. & Bockman, R. S. Gallium nitrate for acute treatment of cancer-related hypercalcemia: clinicopharmacological and dose response analysis. Cancer Res. **46,** 4208–4212 (1986).
328. Warrell, R. P., Alcock, N. W. & Bockman, R. S. Gallium nitrate inhibits accelerated bone turnover in patients with bone metastases. JCO **5,** 292–298 (1987).
329. Synthèse et caractérisation de biomatériaux phosphocalciques multiphasés dopés ou non avec des inhibiteurs de la résorption osseuse. (Université de Nantes, 2011).
330. Strazic, I. Gallium, un candidat prometteur pour le traitement des pathologies osseuses. (Nice, 2015).
331. Bernstein, L. R. Powder X-ray crystallography of gallium 3-hydroxy-4-pyronates. Powder Diffraction **10,** 140–142 (1995).
332. Pollina, G. F., Pepe, M., Dean, A., Di Marco, V. & Marton, D. Reduction in absorption of gallium maltolate in adult horses following oral administration with food: chemistry and pharmacokinetics. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **36,** 456–461 (2013).
333. Mukha, S. A. et al. Synthesis and Properties of Metal Chelates Based on Natural γ-Pyrone Maltol. Chemistry for sustainable development **15,** 448–458 (2007).
334. Allen, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. Acta Cryst B, Acta Cryst Sect B, Acta Crystallogr B, Acta Crystallogr Sect B, Acta Crystallogr Struct Sci, Acta Crystallogr Sect B Struct Sci, Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater **58,** 380–388 (2002).
335. Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, Revision D.01. (2009).
336. Zhao, Y. & Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. Theoretical Chemistry Accounts **120,** 215–241 (2008).
337. O'Neill, R. et al. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. Acta Biomaterialia **50,** 1–19 (2017).
338. Official journal of the european union. **55,** (2012).
339. Massiot, D. et al. 71GaNMR of reference GaIV, GaV, and GaVI compounds by MAS and QPASS, extension of gallium/aluminum NMR parameter correlation. Solid State Nuclear Magnetic Resonance **15,** 159–169 (1999).

340. Parker, D., Waldron, B. P. & Yufit, D. S. Crystallographic and solution NMR structural analyses of four hexacoordinated gallium(III) complexes based on ligands derived from 6-amino-perhydro-1,4-diazepine. Dalton Trans **42,** 8001–8008 (2013).
341. Lu, Y. & Chen, S. C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. **56,** 1621–1633 (2004).
342. Bryant, C. M. & McClements, D. J. (Department of F. S. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. Trends in Food Science and Technology (United Kingdom) (1998).
343. Dickinson, E., Vliet, T. van & Walstra, P. Studying food colloids: Past, present and future. in Food Colloids, Biopolymers and Materials 391–400 (2003). doi:10.1039/9781847550835-00391
344. Subirade, M. & Chen, L. 10 Food-protein-derived materials and their use as carriers and delivery systems for active food components. Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals 251–278 (2008).
345. Chen, L., Remondetto, G., Rouabhia, M. & Subirade, M. Kinetics of the breakdown of cross-linked soy protein films for drug delivery. Biomaterials **29,** 3750–3756 (2008).
346. Chevalier, E., Chaabani, A., Assezat, G., Prochazka, F. & Oulahal, N. Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate-A comparative study of waxes and potassium sorbate effect. FOOD PACKAGING SHELF LIFE **16,** 41–50 (2018).
347. Li, N.-N., Fu, C.-P. & Zhang, L.-M. Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release. Materials Science and Engineering: C **36,** 287–293 (2014).
348. Song, F., Zhang, L.-M., Shi, J.-F. & Li, N.-N. Novel casein hydrogels: Formation, structure and controlled drug release. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **79,** 142–148 (2010).
349. Ding, G.-J. et al. Hydrothermal synthesis of nanorod-assembled porous microspheres of hydroxyapatite/casein using ATP as a phosphorus source and casein sodium salt as a template. Materials Letters **160,** 242–245 (2015).
350. Payne, R. G., Yaszemski, M. J., Yasko, A. W. & Mikos, A. G. Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. Biomaterials **23,** 4359–4371 (2002).
351. Abdelaziz, H. M. et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. J. Control. Release **269,** 374–392 (2018).
352. Livney, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. Current Opinion in Colloid & Interface Science **15,** 73–83 (2010).
353. Lucey, J. A., Johnson, M. E. & Horne, D. S. Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. Journal of Dairy Science **86,** 2725–2743 (2003).
354. Broyard, C. & Gaucheron, F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. Dairy Science & Technology **95,** 831–862 (2015).
355. Payens, T. A. Les propriétés physico-chimiques des caséines alpha s1, bêta et kappa. Le Lait **62,** 306–320 (1982).
356. Djamen, M. C. N. Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes. 191
357. HadjSadok, A., Pitkowski, A., Nicolai, T., Benyahia, L. & Moulai-Mostefa, N. Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. Food Hydrocolloids **22,** 1460–1466 (2008).

358. O'Kennedy, B. T., Mounsey, J. S., Murphy, F., Duggan, E. & Kelly, P. M. Factors affecting the acid gelation of sodium caseinate. Int. Dairy J. **16,** 1132–1141 (2006).
359. Pitkowski, A., Nicolai, T. & Durand, D. Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. Food Hydrocolloids **23,** 1164–1168 (2009).
360. Elzoghby, A. O., Abo El-Fotoh, W. S. & Elgindy, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. Journal of Controlled Release **153,** 206–216 (2011).
361. Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. & Livney, Y. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. Food Hydrocolloids **21,** 936–942 (2007).
362. Arboleya, J. & Wilde, P. Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. Food Hydrocolloids **19,** 485–491 (2005).
363. Pereda, M., Aranguren, M. I. & Marcovich, N. E. Characterization of chitosan/caseinate films. Journal of Applied Polymer Science **107,** 1080–1090 (2008).
364. Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. del C. & Jiménez, A. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. Journal of Food Engineering **114,** 486–494 (2013).
365. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains. Progress in Biophysics and Molecular Biology **74,** 141–173 (2000).
366. Fricke, H. & Hart, E. J. Chemical dosimetry. in Radiation Dosimetry **Vol II,** Chapter 12 (Academic Press, 1966).
367. Hitoshi, K., Tsuneki, I. & Hitoshi, Y. Radiation chemistry in alanine irradiated with g-rays and ion beams. Appl. Radiat. Isot. **47,** 1205–1209 (1996).
368. Ferradini, C. & Pucheault, J. *Biologie de l'action des rayonnements ionisants*. (Masson, 1983).
369. Gaucheron, F., Molle, D., Briard, V. & Le, J. Identification of low molar mass peptides released during sterilization of milk. International Dairy Journal 7 (1999).
370. Schubert, J. Mutagenicity and Cytotoxicity of Irradiated Foods and Food Components. Bull. Org. mond. Santé **41,** 873–904 (1969).
371. Uchiyama, S. & Uchiyama, M. Free Radical Production in Protein-Rich Food. Journal of Food Science **44,** 1217–1220 (1979).
372. Uchiyama, S. & Uchiyama, M. Properties of Free Radicals in Protein and Amino Acid Pyrolysates. Journal of Food Science **46,** 113–116 (1981).

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'un os 6
Figure 2 : Anatomie d'un os long 6
Figure 3 : Représentation des échanges entre la surface d'une apatite et le milieu biologique[31] 7
Figure 4 : Cycle du remodelage osseux. Figure adaptée[32] 9
Figure 5 : Déficiences osseuses : causes traumatiques (A) fracture ou causes pathologiques (B) ostéoporose, (C) ostéosarcome 10
Figure 6 : Évolution des propriétés intrinsèques d'un CPC au cours du temps. Figure adaptée[63] 19
Figure 7 : Dispositif des aiguilles de Gillmore 20
Figure 8 : Méthodes d'association d'un CPC et d'un principe actif. 1. Association avant la préparation du ciment, le PA est intégré soit dans la phase solide du ciment (A) ou solubilisé dans le durcisseur (B). 2. Association après la prise du ciment par imprégnation du CPC avec une solution contenant le PA (C)[11] 27
Figure 9 : Représentation schématique des formes du PA dans le CPC : (A) dissous dans la phase liquide, (B) adsorbés ou liés chimiquement à la surface des cristaux de PCa et (C) sous forme solide[11] 28
Figure 10 : Représentation schématique de la libération de PA en fonction des différents mécanismes 29
Figure 11 : Illustration des phénomènes de l'hyperalgésie et de l'allodynie[167] 35
Figure 12 : Échelle thérapeutique de la douleur selon l'OMS 38
Figure 13 : Illustration des sites d'action différents et des molécules pouvant être utilisées dans l'analgésie multimodale 39
Figure 14 : (A) Coupe transversale d'une fibre nerveuse et répartition ionique. (B) Représentation de l'influx nerveux avec (1) le potentiel de repos, (2) la phase de dépolarisation, (3) la phase de repolarisation et (4) la phase d'hyperpolarisation avec les ions sodium (bleu) et les ions potassium (violet) 41
Figure 15 : Structure des anesthésiques locaux 42
Figure 16 : Exemple du mode d'action de la bupivacaïne. Figure adaptée [187] 43
Figure 17 : Représentation schématique des différentes matrices, nanoparticule, liposome, β-cyclodextrine et CPC 47
Figure 18 : Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert), le Ropi-CPC (rouge), + pic de l'apatite, - pic de l'α-TCP et * pic de la monétite 58
Figure 19 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert), le Ropi-CPC (rouge) et - - - zone de visualisation du PA 58
Figure 20 : (A) Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, avec le CPC (noir), le Bupi-CPC (bleu), le Levo-CPC (vert)et le Ropi-CPC (rouge). (B) Déconvolution du spectre RMN MAS ^{31}P du CPC (rouge) avec la CDA (vert), l'α-TCP (violet) et le DCPA (bleu) 59
Figure 21 : Injectabilité du CPC (noir) et du Bupi-CPC (bleu) en fonction du temps (3, 5 et 8 min) 61
Figure 22: Bupi-CPC après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C 61

Figure 23 : Propriétés mécaniques des ciments (contrôle et chargés en anesthésiques locaux) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec (A) la résistance à la compression des ciments et (B) les courbes de compression des ciments 62
Figure 24 : Photographies MEB du ciment contrôle après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher. 64
Figure 25 : Photographies MEB des ciments chargés en anesthésiques locaux après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher. 65
Figure 26 : Photographies MEB des trois anesthésiques locaux (bupivacaïne, levobupivacaïne et ropivacaïne) à différents grandissements (A et B) et des ciments chargés en anesthésiques locaux (C) après 72 h de prise à 37 °C dans une étuve saturée en eau et ← les PA 67
Figure 27 : Spectres RMN MAS ^{13}C des trois anesthésiques locaux purs (a, d, g) et chargé dans le CPC après 72 h de prise à 37 °C dans une étuve saturée en eau (b, e, h) et dans NaCl (c, f, i). ↓ nouveaux pics, * HPMC 69
Figure 28 : Libérations de la bupivacaïne (bleu) et de la ropivacaïne (rouge) en fonction du temps 73
Figure 29 : Protocole de la cartographie par spectroscopie raman. (A) Fracture au cutter du cylindre, (B) prévisualisation de la surface et (C) cartographie. 75
Figure 30 : Spectre Raman (A) d'un ciment après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline et (B) de la bupivacaïne et (C) répartition bupivacaïne/phosphate d'un ciment chargé après 0 h de prise 76
Figure 31 : Répartition de la bupivacaïne par cartographie raman de ciments combinés après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 48 h et (F)72 h de libération à 37 °C dans une solution saline 77
Figure 32 : Représentation des points chauds de bupivacaïne par cartographie raman de ciments combinés après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 48 h et (F)72 h de libération à 37 °C dans une solution saline 77
Figure 33 : Corrélation entre la surface contenant de la bupivacaïne et la quantité du PA restant dans le Bupi-CPC 78
Figure 34 : Libération de la levobupivacaïne en fonction du temps 79
Figure 35 : Photographies MEB des trois anesthésiques locaux broyés : bupivacaïne (A), levobupivacaïne (B) et ropivacaïne (C) 80
Figure 36 : Cinétique de dissolution des anesthésiques locaux non broyés (A, B, C) et broyés (D, E, F) dans une solution NaCl à 22 °C avec (A, D) bupivacaïne, (B, E) ropivacaïne et (C, F) levobupivacaïne) 81
Figure 37 : Libérations de la bupivacaïne (bleu) et de la ropivacaïne (rouge) broyées en fonction du temps avec - - - les courbes de référence des PA non broyés 82
Figure 38 : Courbes DSC (A) et ATG (B) de la bupivacaïne (bleu), de la ropivacaïne (rouge) et de la levobupivacaïne (vert) 84
Figure 39 : Spectres IR de (A) la bupivacaïne déshydratée (bleu clair), (B) la bupivacaïne hydratée (bleu foncé), (C) la ropivacaïne déshydratée (rouge clair), (D) la ropivacaïne hydratée (rouge foncé) et (E) la levobupivacaïne anhydre (vert) 86
Figure 40 : Photographies MEB de la levobupivacaïne lot 1 (A) et lot 2 (B, C) 87
Figure 41 : Diffractogrammes de la levobupivacaïne lot 1 (vert foncé) et lot 2 (vert clair) 88
Figure 42 : Spectres IR de la levobupivacaïne lot 1 (vert foncé) et lot 2 (vert clair) 89
Figure 43 : Spectre RMN MAS ^{13}C de la levobupivacaïne lot 1 (A) et lot 2 (B) 90
Figure 44 : Libération de la levobupivacaïne (lot1) et de la levobupivacaïne (lot2) en fonction du temps et comparaison avec la libération de la bupivacaïne broyée (---) 90

Figure 45 : Exemple de grille d'évaluation de la douleur postopératoire élaborée par l'association 4A-Vet pour le chat 97
Figure 46: Méthode visuelle de graduation de la douleur. (A) EthoVision™ et cartographies thermiques (B) d'un animal contrôle et (C) d'un animal pathologique 98
Figure 47 : Application de la pointe du Von Frey sur la patte arrière d'un rat (A) et localisation de la zone testée (B)[241] 98
Figure 48 : Analyse de la marche d'un rat selon différents dispositifs. (A) DigiGait™ vue de face et (B) CatWalk™, intérieur du couloir vue de profil 101
Figure 49 : Implantation de ciment. (A) Création d'un défaut cylindrique de taille critique, (B) Injection du ciment, (C) Défaut rempli avant la fermeture de la plaie 103
Figure 50 : Image d'un rat vu du dessous dans le système Catwalk 105
Figure 51 : Empreinte d'une patte arrière d'un rat sous la forme (A) complète et (B) décomposée. 105
Figure 52 : Appareillage du système Catwalk™ XT (A) Entier vue de face et (B) Couloir vue de profil en condition d'expérimentation 106
Figure 53 : Exemple des différents paramètres du système Catwalk avec (A) une représentation spatiale des empreintes avec les empreintes des pattes gauches (rouge), les pattes droites (bleu), les membres postérieurs (couleurs claires) et les membres antérieurs (couleurs foncées), (B) une représentation temporelle de la marche et (C) une visualisation d'une empreinte de patte arrière droite représentée en échelle d'intensité 107
Figure 54: Print area (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires 112
Figure 55 : Intensity (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires 113
Figure 56 : Manual print length (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires 114
Figure 57: Duty Cycle (A) graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres et (B) représentation du paramètre à 24 h postopératoires 114
Figure 58 : Diagrammes de dispersion des variables (A) Max contact intensity (B) Manual print length et (C) Stand d'une patte postérieure droite avant l'opération en fonction de la vitesse avec le groupe du CPC (gris), celui du Bupi-CPC (bleu) et celui du Ropi-CPC (rouge) 116
Figure 59 : (A) Intensité moyenne (■ ■ ■ ■) et maximale (−) à 24 h postopératoires pour chaque empreinte de patte et (B) intensités des empreintes des membres (opéré et non opéré) en 3D 117
Figure 60 : Max Contact intensity et manual print lenght (A) du membre opéré et (B) du membre opéré par rapport au membre controlatéral. Graphique en % avec le (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir),* p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres 118
Figure 61 : Stand (A) du membre opéré et (B) du membre opéré par rapport au membre controlatéral. Graphique en % avec le CPC (gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noire), * p < 0,01 Bupi-CPC vs Ropi-CPC vs CPC, ** p < 0,01 Ansth-CPCs vs CPC, # p < 0,01 Bupi-CPC vs les autres 119

Figure 62 : Diagramme de coordination des pattes. (A) Motif de pas d'un animal avant l'opération et (B) d'un animal implanté d'un CPC à 24 heures postopératoire. Les points (i) bleus, correspond au début du motif, (ii) verts, correspond aux pas qui font partis d'un motif, (iii) rouges, correspond aux pas qui ne font pas partis d'un motif et (iv) jaunes, correspond aux pas qui ne sont pas pris en compte. 120
Figure 63 : Regularity index (A) graphique en % avec le CPC(gris), le Bupi-CPC (bleu), le Ropi-CPC (rouge) et la ligne de base (pointillé noir) 121
Figure 64 : Exemple de paramètres impactés par le stress (A) Swing (B) Step cycle et (C) Average speed avec CAAPRO 1 (noir), CAAPRO 2 (gris), **p < 0,05 et *p < 0,01 124
Figure 65 : Photographies MEB de fémur après 3 semaines d'implantation. La région d'intérêt (RDI) analysée à l'aide du logiciel Leica QWin Pro correspondait à (A) une zone bioactive (zone bleue plus claire) comprenant (B) l'os nouvellement formé (zone verte) et (C) la surface résorbée du ciment (zone bleue)..... 126
Figure 66 : Reconstruction 3D des fémurs après 3 mois d'implantation chez le modèle du rat avec (A) le CPC contrôle et (B, C, D) les plans : sagittal, frontal et transversal du substitut 127
Figure 67 : Photographie MEB de la partie distale d'un fémur droit après 3 semaines d'implantation d'un substitut osseux chez le rat avec (A) le CPC (B) le Bupi-CPC et (C) le Ropi-CPC 128
Figure 68 : Photographie MEB de ciment après 3 mois d'implantation chez le rat. (A) Partie distale d'un fémur droit non opéré (B) Création d'un défaut cylindrique de taille critique et (C, D, E) clichés des ciments (contrôle et chargés) après 3 mois d'implantation..... 129
Figure 69 : Images histologiques des échantillons fémoraux après 3 semaines d'implantation. (A) À faible grossissement en coloration Movat avec le ciment (bleu), l'os (jaune-vert), le tissu mou (rose clair), (B) Détails de la nouvelle formation osseuse en coloration Movat avec le tissu ostéoïde (ligne rouge) et la lignée cellulaire ostéoblastique (ligne violette) et (C) Observation de la moelle osseuse en coloration HE..... 130
Figure 70 : Analyse histologique des échantillons fémoraux après 3 mois d'implantation. (A). À faible grossissement en coloration Movat avec le ciment (bleu), l'os (jaune-vert), le tissu mou (rose clair) et (B) détails de l'interface CPC/os en coloration Movat..... 131
Figure 71 : Évolution de la masse osseuse au cours de la vie avec la représentation des phases I, II et III. Figure adaptée [63]..... 137
Figure 72 : Structure d'un os spongieux normal (A) et d'un os spongieux ostéoporotique (B)[279] 138
Figure 73 : Ostéolyse engendrée par des métastases osseuses provenant de différents types de cancers (sein, poumon et rein) [284]..... 139
Figure 74 : Différents composés thérapeutiques à base de gallium [293] 141
Figure 75 : Modification de la radio-opacité du β-TCP par l'incorporation de gallium. Photographie non publiée P. Janvier..... 143
Figure 76 : Diffractogramme du GaM 151
Figure 77 : Spectre IR du GaM 152
Figure 78 : Impact de la vibration à 1666 cm^{-1} (A) sur le maltol et (B) sur le GaM..... 153
Figure 79: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-7G (violet), + pic de l'apatite, - pic de l'α-TCP, * pic de la monétite et # pic du GaM 156
Figure 80 : Spectres des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-3,5G (rose), le CPC-7G (violet) et - - - zone de visualisation du PA..... 156
Figure 81 : (A) Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir) et le CPC-7G (violet) (B)

Déconvolution du spectre RMN MAS ^{31}P du CPC-7G (rouge) avec la CDA (vert), l'α-TCP (violet) et le DCPA (bleu) 157
Figure 82 : Injectabilité des ciments CPC (noir) et CPC-7G (violet) en fonction du temps (3, 5 et 8 min) 158
Figure 83 : Propriétés mécaniques des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C avec (A) la résistance à la compression des ciments et (B) les courbes de compression des ciments 159
Figure 84 : Photographies MEB des ciments (contrôle et chargés en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à fort grandissement et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher 161
Figure 85 : Photographies MEB des cristaux de maltolate de gallium, (A) à faible grandissement et (B) à fort grandissement 162
Figure 86 : Photographies MEB des ciments chargés en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline, (A) à faible grandissement, (B) à faible grandissement avec une préparation au crosspolisher et (C) à fort grandissement avec une préparation au crosspolisher 162
Figure 87 : (A) Photographie MEB d'un CPC-7G après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec une cartographie (B) phosphore (bleu), (C) calcium (jaune) et (D) gallium (rouge) 163
Figure 88 : Spectres RMN MAS ^{71}Ga (A) du maltolate de gallium pur, du CPC-7G après 72 h de prise à 37 °C (B) dans une étuve saturée en eau et (C) immergé dans NaCl 164
Figure 89: (A) Simulation et (B) spectre expérimental RMN MAS ^{71}Ga du maltolate de gallium 165
Figure 90: Libération du gallium en fonction du temps du CPC-3,5G (rouge foncé) et du CPC-7G (rouge) 167
Figure 91 : Spectres UV du GaM dans l'eau en fonction de la concentration, de 3 (bleu clair) à 30 ppm (bleu foncé) 168
Figure 92 : Spectres UV du CPC-7G à (A) 1 h, (B) 1 j, (C) 9 j et (D) 110 j de libération avec le spectre expérimental (noir), la décompositon (rouge), le GaM (violet) et le maltol (orange) 169
Figure 93 : Libération du maltol en fonction du temps du CPC-3,5G (jaune) et du CPC-7G (orange) 170
Figure 94 : Spectres raman (A) du GaM et (B) du maltol 171
Figure 95 : Répartition du GaM par cartographie raman du CPC-7G après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 72 h, et (F) 192 h de libération à 37 °C dans une solution saline 172
Figure 96 : Répartition des points chauds du GaM par cartographie raman du CPC-7G après (A) 0 h, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 24 h, (E) 72 h, et (F) 192 h de libération à 37 °C dans une solution saline 172
Figure 97 : Corrélation entre la surface contenant du principe actif et la quantité du PA restant dans le CPC 174
Figure 98 : Représentation schématique des courbes de contrainte d'un matériau (A) fragile et (B) ductile 182
Figure 99 : (A) Résistance à la compression et (B) courbes des ciments : GEN (noir), GEN-3C(L) (turquoise clair) et GEN-6C(L) (turquoise foncé) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C 183
Figure 100 : (A) Résistance à la compression et (B) courbes des ciments : GEN (noir), GEN-3C(P) (turquoise clair) et GEN-6C(P) (turquoise foncé) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C 183
Figure 101 : Photographies MEB à fort grandissement du GEN (A), du GEN-3C(L) (B), du GEN-6C(L) (C) et GEN-12C(L) (D) dans la phase liquide après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline 184

Figure 102 : (A) Injectabilité et (B) % de pâte de ciment extrudée du GEN (noir), du GEN-1C(P) (turquoise clair) et du GEN-2C(P) (turquoise foncé) à 3, 5 et 8 min 185
Figure 103: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en caséine) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir) et le CPC chargé en caséine (turquoise) avec (A) CPC-1C, (B) CPC-2C(2) et (C) CPC-2C(5), + pic de l'apatite, - pic de l'α-TCP et * pic de la monétite 187
Figure 104 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en caséine) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC(2) (noir), le CPC-2C(2) (turquoise) et - - - zone de visualisation de la caséine C..... 187
Figure 105 : Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC combiné (turquoise) avec (A) CPC-1C, (B) CPC-2C(2) et (C) CPC-2C(5), la déconvolution (rouge), la CDA (vert), l'α-TCP (jaune) et le DCPA (bleu) 188
Figure 106 : Injectabilité des ciments : (A) CPC (noir) et CPC-1C (turquoise clair) et (B) CPC-2C(2) (turquoise foncé) en fonction du temps (3, 5 et 8 min)..... 190
Figure 107 : Photographies (A) d'un ciment contrôle ; CPC (L/P = 0,45 avec Na_2HPO_4 à 0,5 □) et (B) d'un ciment chargé en caséine ; CPC-1C (L/P = 0,45 avec Na_2HPO_4 à 0,5 %), après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C 191
Figure 108 : (A) Résistance en compression des CPC-1C, CPC-2C(2), CPC-2C(5) et leur contrôle CPC, CPC(2) et CPC(5) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline et (B) courbes avec CPC-1C (turquoise clair), CPC-2C(2) (turquoise foncé) et CPC-2C(5) (turquoise pointillé) 192
Figure 109 : Photographie d'une pastille de ciment combiné avec de la caséine après dissolution du phosphate de calcium par une solution de HCl à 5 %..... 193
Figure 110: Irradiateur gamma..... 196
Figure 111 : (A) Signal RPE et (B) radical du TEMPO..... 200
Figure 112 : Signal RPE du radical de l'alanine formé après irradiation γ..... 200
Figure 113 : Signal RPE enregistré à 100K de la caséine après 1 j (turquoise) et 3 j (bleu foncé) d'irradiation (A) à une puissance de 0,08 mW et (B) à une puissance de 100 mW..... 201
Figure 114 : Étude de la formation de H_2 (en bleu) et de CO_2 (en orange) en fonction de l'énergie absorbée par la caséine..... 202
Figure 115 : Chromatogrammes de la caséine non irradiée (bleu) et irradiée (rouge)..... 203
Figure 116: Diffractogrammes des ciments (contrôle et chargés en caséine et en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-1C (turquoise), le CPC-1C-7G (violet), + pic de l'apatite, - pic de l'α-TCP, * pic de la monétite et # pic du GaM .. 206
Figure 117 : Spectres IR des ciments (contrôle et chargés en caséine et en GaM) après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC (noir), le CPC-1C (turquoise), le CPC-1C-7G (violet) et - - - zone de visualisation de la C et du PA 206
Figure 118 : Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec le CPC combiné (violet) avec (A) CPC-1C-7G, (B) CPC-2C-7G(2) et (C) CPC-2C-7G(5), la déconvolution (rouge), la CDA (vert), l'α-TCP (jaune) et le DCPA (bleu)..... 207
Figure 119 : Photographies de ciments chargés en caséine et en GaM après une semaine de prise dans une solution saline à 37 °C (A) CPC-1C-7G et (B) CPC-2C-7G(2)..... 208
Figure 120 : Résistance à la compression des ciments contrôle (noir), chargé en caséine (turquoise) et chargé en caséine et en GaM (violet) après 72 h de prise dans une solution saline à 37 °C..... 209
Figure 121 : Photographies MEB des ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec une préparation au crosspolisher, observation de l'inter-

grain à fort grandissement (★ inter-grain) avec (A) CPC-1C-7G, (B) CPC-2C-7G (2) et (C) CPC-2C-7G (5) 211
Figure 122 : Photographies MEB des ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline avec une préparation au crosspolisher, (A) observation de la répartition du GaM à faible grandissement, (B) observation du GaM à fort grandissement . 212
Figure 123 : Libération du gallium en fonction du temps pour les CPCs : CPC-1C-7G (orange), CPC-2C-7G(2) (rouge), CPC-2C-7G(5) (marron) et le CPC-7G (noir pointillé) 213
Figure 124 : Libération du gallium (pointillé noir) et du GaM (marron) en fonction du temps pour le CPC-2C-7G(5) 214
Figure 125 : Libération du maltol en fonction du temps pour les CPCs : CPC-1C-7G (orange), CPC-2C-7G(2) (rouge), CPC-2C-7G(5) (marron) et le CPC-7G (noir pointillé) 215

Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des propriétés des greffons[1] 11
Tableau 2 : Principaux phosphates de calcium utilisés comme substituts osseux[43,44,46] 14
Tableau 3 : Valeurs de n en fonction du mécanisme de libération d'un PA à partir de matrice de géométrie différente[135,136] 31
Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des anesthésiques locaux d'intérêts 45
Tableau 5 : Résumé des différents échantillons utilisés 56
Tableau 6 : Résumé des propriétés texturales des différentes formulations de ciment 60
Tableau 7 : Densité et porosité des différents CPCs après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline 63
Tableau 8 : Analyses de la bupivacaïne, de la levobupivacaïne et de la ropivacaïne par spectrométrie de masse et RMN liquide (^{1}H et ^{13}C) 71
Tableau 9 : Comparaison des profils de libération de la bupivacaïne et de la ropivacaïne selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 74
Tableau 10 : Comparaison des profils de libération de la levobupivacaïne selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 80
Tableau 11 : Comparaison des profils de libération de la bupivacaïne et la ropivacaïne après broyage selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 83
Tableau 12 : Résumé des principales bandes de vibrations des différents groupements des anesthésiques locaux utilisés 85
Tableau 13 : Comparaison des profils de libération de la levobupivacaïne (lot1) et de la levobupivacaïne (lot2) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 91
Tableau 14 : Récapitulatif des différents groupes d'animaux avec les conditions d'implantations 104
Tableau 15 : Résumé des paramètres spatiaux du CatWalk 108
Tableau 16 : Résumé des paramètres temporels du CatWalk 109
Tableau 17 : Résumé des paramètres d'intensités du CatWalk 110
Tableau 18: Paramètres d'évaluation de la coordination 110
Tableau 19 : Résumé des études en fonction des expérimentations effectuées 111
Tableau 20 : Résultats des CMI et des CMB de la bupivacaïne en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. aureus 133
Tableau 21 : Résultats des CMI et des CMB de la bupivacaïne en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. epidermidis 134
Tableau 22 : Résultats de la modélisation des bandes de vibration $\nu_{C=O}$ et $\nu_{C=C}$ du GaM 152
Tableau 23 : Résumé des différents échantillons utilisés dans l'étude d'un CPC combiné avec un complexe de gallium 154
Tableau 24 : Résumé des propriétés texturales des différentes formulations de ciment charge en GaM 157
Tableau 25 : Densités et porosités des différents CPCs chargés en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline 160
Tableau 26 : Comparaison des profils de libération du maltol des CPC-3,5G et CPC-7G selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 170
Tableau 27 : Résultats des CMI et des CMB du GaM en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. aureus 176
Tableau 28 : Résultats des CMI et des CMB du GaM en fonction de la concentration en bactérie de la souche S. epidermidis 176

Tableau 29 : Propriétés caractéristiques des caséines α_{S1}, α_{S2}, β et κ[354,355] 179
Tableau 30 : Résumé des différentes formulations utilisées 186
Tableau 31 : Résumé des propriétés texturales des CPC-1C et CPC-2C 189
Tableau 32 : Densités et porosités des différents CPCs chargés en caséine après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline 193
Tableau 33 : Résumé des principales bandes de vibrations des différents groupements du caséinate de sodium et du réseau de caséine[363–365] 195
Tableau 34 : Résumé de formulations étudiées 205
Tableau 35 : Résumé des propriétés texturales des CPCs chargés en GaM et en caséine 208
Tableau 36 : Densité et porosité des différents ciments chargés en caséine et en GaM après 72 h de prise à 37 °C dans une solution saline 210
Tableau 37 : Comparaison des profils de libération du Ga des CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 215
Tableau 38 : Comparaison des profils de libération du Maltol des CPC-1C-7G, CPC-2C-7G(2) et CPC-2C-7G(5) selon les modèles de Higuchi et de Korsmeyer et Peppas 216

American Pain Society
RESEARCH
EDUCATION
TREATMENT
ADVOCACY
PUBLISHED BY ELSEVIER

The Journal of Pain, Vol 19, No 10 (October), 2018: pp 1169–1180
Available online at www.jpain.org and www.sciencedirect.com

Pain Management After Bone Reconstruction Surgery Using an Analgesic Bone Cement: A Functional Noninvasive In Vivo Study Using Gait Analysis

Manon Dupleichs,[*,†] Martial Masson,[†,§,‖] Olivier Gauthier,[†,‡] Maeva Dutilleul,[†,§,‖] Jean-Michel Bouler,[*] Elise Verron,[*,†,1] and Pascal Janvier[*,1]

[*]*CEISAM, CNRS UMR 6230, University of Nantes, Nantes, France,* [†]*RMeS-lab, INSERM UMR 1229, University of Nantes, Nantes, France,* [‡]*ONIRIS, Nantes Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, Nantes, France,* [§]*INSERM, UMS 016, CNRS 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, SC3M facility, CHU Nantes, Université de Nantes, Nantes, France,* [‖]*Université de Nantes, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France.*

Abstract: **Postoperative pain after bone reconstruction is a serious complication that could jeopardize the global success of a surgery. This pain must be controlled and minimized during the first 3 to 4 postoperative days to prevent it from becoming chronic. In this study, a critical-size bone defect was created at the femoral distal end of rats and filled by an injectable calcium phosphate cement (CPC) loaded or not with local anesthetics (bupivacaine or ropivacaine). A functional evaluation of the gait was performed using the CatWalk system to compare the postoperative pain relief enhanced by the different CPCs after such a bone filling surgery. The results demonstrated significant pain relief during the short-term postoperative period, as shown by the print area and intensity parameters of the operated paw. At 24 hours, the print area decreased by 65%, 42%, and 24%, and the intensity decreased by 25%, 9%, and 1% for unloaded, ropivacaine-loaded, and bupivacaine-loaded CPCs, respectively, compared with the preoperative values. Bupivacaine-loaded CPC provided an earlier return to full functional recovery than ropivacaine-loaded CPC. Moreover, the CPCs retained their biologic and mechanical properties. For all these reasons, anesthetic-loaded CPCs could be part of the global pain management protocol after bone reconstruction surgery such as iliac crest bone grafting procedures.**

Perspective: ***Bupivacaine-loaded CPC provided an earlier return to full gait function than ropivacaine-loaded CPC, with preserved bone filling properties. Such analgesic CPCs deserve further in vivo investigation and may be part of the global pain management protocol after bone reconstruction or bone augmentation surgery such as iliac crest bone grafting.***

© 2018 by the American Pain Society

Key words: *Bone pain, calcium phosphate cement, drug-device combination, local anesthetic drug, CatWalk gait analysis*

Postoperative pain after bone reconstruction is one of the most frequent undesirable complications, especially in bone iliac crest graft procedures.[15,24,28,36,42,54] This pain significantly disrupts patient recovery by reducing their mobility, delaying their functional recovery, increasing their hospital stay, and decreasing their quality of life and autonomy.[37,53] Furthermore, recent data suggest that chronic pain could induce changes at the immune system level by modifying immune cell gene expression.[29] This could point to a potential connection between the pain and discomfort felt and the inflammatory/healing process after bone surgery.

Pain management during the first 4 postoperative days[5,41,44] should be as efficient as possible to minimize the risk of developing chronic pain. The conventional treatment is to administer conventional systemic analgesics such as acetaminophen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and morphine-derived products. Paracetamol

Received August 5, 2017; Revised December 23, 2017; Accepted April 26, 2018.
Funding for this study was provided by the University of Nantes through the interdisciplinary "CAAPRO project 2015-67."
The authors have no conflicts of interest to declare.
[1] E.V. and P.J. contributed equally to the supervision of this work. Address reprint requests to Elise Verron, PharmD, PhD, University of Nantes, CEISAM, 44042 NANTES, France. E-mail elise.verron@univ-nantes.fr
1526-5900/$36.00
© 2018 by the American Pain Society
https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.04.014

is definitively not strong enough to relieve postoperative pain, and nonsteroidal antiinflammatory drugs can cause gastric complications[40] and delay bone healing.[21] Finally, opioids can cause multiple complications (gastric, pulmonary) that could hinder recovery and increase hospitalization length. Furthermore, analgesic prescriptions increase overall costs, thus adding an economic burden on the health care system. In addition to the systemic approach, patients are also administered local anesthetics as a bolus dose or via catheter. Human medicine surgeons often use continuous controlled administration of local anesthetics at surgical sites or around nerves that innervate the site. Local administration provides analgesia at the target site with limited systemic effects, and some studies have demonstrated the value of using local analgesia to prevent chronic pain.[3,8,43] For example, infusion of bupivacaine, either into the wound or as a local nerve block proved to be an effective analgesic technique for pain control during the recovery phase after iliac crest bone grafting. This reduced the use of opioids by 50% without decreasing the analgesic effect,[43] a finding that is of major interest in elderly patients.

Calcium phosphate (CaP) bone substitutes and CaP cements (CPC) are now considered the gold standard[28] treatment for many bone filling orthopedic surgery indications. They can be resorbed by cells, present evidenced osteoconductive properties,[2,10,28,38,39] and can be associated with bioactive molecules and therapeutic agents to act as local drug delivery systems.[47,50] We previously validated the concept of analgesic bioactive bone substitute combining CaP granules and bupivacaine, one of the most commonly used local anesthetics in bone surgery. In vivo analgesic properties of our combined device demonstrated a significant dose-dependent analgesic effect on a postoperative pain rat model using pressure algometry evaluation.[48] Because CPCs have now become the treatment of choice for many orthopedic and trauma indications,[9,55] we designed an innovative injectable biomaterial combining CPC and different local anesthetic drugs for orthopedic or bone trauma indications.

In the last decade, the CatWalk[26,52] gait analysis system has been demonstrated as a valuable, noninvasive method to assess chronic pain.[16] It has proved to be a reliable method to determine the onset or ongoing nature of a disease, set up a treatment protocol, and evidence rehabilitation. The CatWalk XT (Noldus, Wageningen, The Netherlands) has been validated for experimental rodent procedures to investigate many conditions such as neurodegenerative diseases,[46] myofascial inflammations,[31] peripheral nerve injuries,[14,18] osteoarthritis,[19,32] and trauma.[20] This method analyzes gait through video tracking and delivers a complete analysis of the spatiotemporal parameters of each paw print and dynamic interlimb coordination patterns.

The aims of this study were 1) to investigate postoperative pain after bone filling surgery through functional evaluation using gait analysis with the Catwalk system, 2) to evaluate the benefit in pain relief obtained after bone defect filling with our innovative CPCs, and 3) to assess their mechanical and biologic properties.

Materials and Methods

Preparation of anesthetic-loaded cement

The apatitic calcium phosphate cement[30] used in this study was obtained from Graftys SA (Aix-en-Provence, France). It is composed primarily of alpha-tricalcium phosphate (78%) and was loaded with either bupivacaine or ropivacaine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Local anesthetics were directly introduced into the solid phase at 8% by weight (w/w). The cement paste was prepared by mixing the powder obtained with an aqueous solution of 0.5% Na_2HPO_4. The liquid/powder (l/p) ratio was adjusted to obtain an injectable cement compatible with use in bone surgery, presenting a typical setting time of around 6 to 12 minutes. A 2-cm^3 syringe was used to inject the cement paste into a rat femoral condyle defect. After the setting process, the final product was a porous solid mainly composed of calcium deficient apatite (CDA) loaded with a local anesthetic. Before implantation, all the components were sterilized by gamma irradiation at 25 to 33 kGy. The integrity of the drugs was ensured by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) analyses. The ^1H NMR spectra were recorded on an Advance Bruker 300 MHz (Billerica, MA) and MS spectra on an LTQ-Orbitrap Thermo Fisher Scientific (Charlotte, NC).

Cement handling properties

The initial setting time was determined by using Gillmore's method,[1] Samples were placed in an in-house–made cell (cylindrical form, inner diameter 20 mm, depth 4.7 mm) thermostated at 37̄C with a water bath. The initial setting time was determined when the small Gillmore needle (diameter 2.12 mm, weight 113.4 g) failed to indent the surface of the sample.

The injectability assay was measured with an Advanced Material Testing System (AmetekLS55kN/1124 lbf; Ametek, Inc, Berwyn, PA) equipped with a specific syringe system, including a 2.5-mL syringe (Terumo Corp, Shibuya, Tokyo, Japan) without a needle. This test consists of measuring the force needed to extrude the volume of paste using a compression rate of 1 mm/sec. The injectability measurement was performed 3 minutes after paste preparation.

The compressive strength was measured with an Advanced Material Testing System (AmetekLS55kN/1124 lbf) at a loading rate of 1 mm/sec. The different paste samples were prepared as described above. They were then introduced into cylindrical polytetrafluoroethylene molds (6 mm in diameter and 12 mm in height) and were immersed in sodium chloride aqueous solution for 72 hours. All measurements were performed in triplicate, and results were mean $\pm$ SD.

Anesthetic drug release profiles

Two hundred milligrams of loaded cement were deposited into a six-well culture plate. After waiting 20 minutes at room temperature, cements were immersed

in sodium chloride aqueous solution (0.9% w/w) and were subsequently placed into an incubator at 37̄C equipped with an orbital shaker (120 rpm). Aqueous solutions were removed, filtered (0.45 μm), and replaced with fresh 0.9% sodium chloride at different times. After filtering, the amount of bupivacaine or ropivacaine released into the aqueous solution was determined by UV-visible spectrophotometer assays (UV-2501PC; Shimadzu Corp, Kyoto, Japan) at 262 nm. All experiments were performed in triplicate. Results were expressed as percentage of bupivacaine or ropivacaine released $\pm$ SD over time.

Animal experiments and surgical model

Animals

All animal procedures were approved by the institution's animal welfare committee (Approval No. 5270) and were conducted in accordance with the European guidelines for the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). Rats were housed in dedicated rodent facilities (Approval No. C44015). Eighteen female Wistar rats (Charles River Laboratories), weighing 225 to 250 g, were used. A 1-week quarantine was observed. During the experiment period, animals were housed under standard conditions with a 12-h light/12-h dark cycle and checked every day. Water and food were available as desired.

Surgical procedure

Three different CPCs were tested:

- One unloaded CPC with no anesthetic agent (CPC)
- One CPC loaded with 8% bupivacaine (CPC-Bupi)
- One CPC loaded with 8% ropivacaine (CPC-Ropi)

The animals (n = 18) were then randomly assigned to one of these groups (n = 6 per group).

Surgical procedures were conducted with the animals under general anesthesia induced with an isoflurane/oxygen mixture delivered into an induction chamber and maintained through an individual nose mask. Then a subcutaneous injection of 0.05 mg/kg of buprenorphine hydrochloride (Buprecare; The Cooper Companies, Inc, Pleasanton, CA) was performed as preemptive analgesia. A critical-size cylindrical bone defect (3.1 mm Ø, 5 mm depth) was created in the lateral femoral condyle on the right hind limb of each animal. After hemostasis and drying of the osseous cavity, the defect was filled with one of the tested cements that was gently injected into the cavity (Fig 1). The contralateral leg was left intact. All surgical procedures were performed blindly (ie, the surgeon was unaware of which cement was being injected). Rescue analgesia with additional buprenorphine injection was available throughout the implantation period.

After surgery, a physical examination was performed twice daily with visual control of the surgical site and measurements of cranial-caudal and lateral-medial diameters to evaluate whether hematoma, edema, swelling or biomaterial intolerance occurred. If necessary, an additional injection of buprenorphine hydrochloride (0.05 mg/kg) was given.

Animals were humanely killed 3 weeks after implantation by intracardiac injection of an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol, Fort Worth, TX) after general anesthesia induction.

Postoperative gait analysis with CatWalk system

Principle of the CatWalk analysis

Postoperative gait analysis was performed using the CatWalk XT system as previously described in rats.[25,27] Briefly, the rat had a nonforced run across an illuminated glass plate through an 8-cm wide corridor. Upon contact with the glass plate, the paw reflected the green light to a video camera below (100 Hz), which recorded the entire run (Fig 2A). Gait-related parameters were reported for each animal and each run. No food inducement was provided.

Test procedures

The gait analysis was conducted according to the following protocol:

Two weeks prior to the implantations, the rats were habituated and trained to run freely through the corridor daily. The last preoperative run, the day before surgery, was considered as the preoperative reference value. To limit interanimal variability, each operated rat was compared with its own preoperative data. CatWalk analysis was repeated after surgery at t = 2, 4, 6,

Figure 1. Implantation of cement. (A) Creation of a critical-size cylindrical defect. (B) Injection of the cement. (C) Filled defect before wound closure.

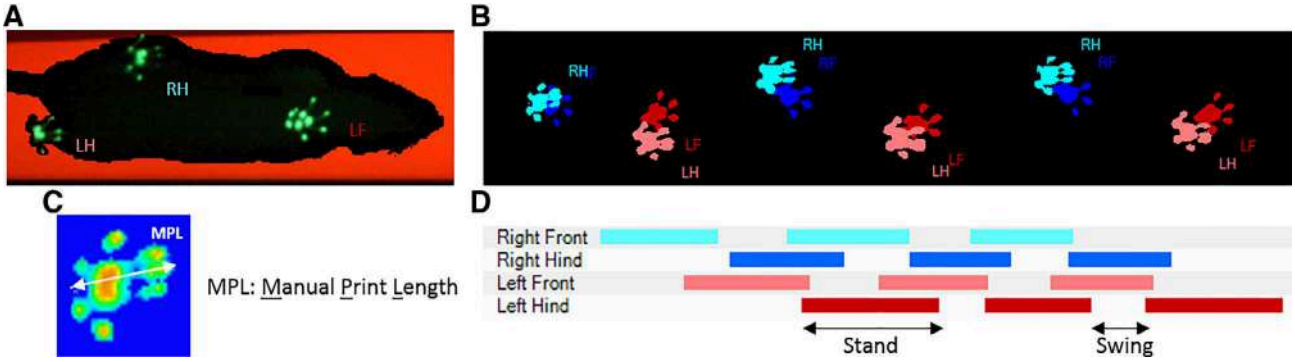


Figure 2. Gait analysis of a healthy rat by the CatWalk system. (A) Picture of the healthy rat in the Catwalk system. (B) CatWalk footprints (print area) before surgery. The footprints on the left limbs are in red while the right limbs are in blue. The hind limbs are represented in light color, and the front limbs are darker. (C) A normal right hind paw with manual print length measurement and intensity scale. (D) CatWalk gait diagram before surgery.

24, 48, and 72 hours and t = 7 and 14 days. Gait analysis experiments were conducted blindly by the same investigator who was unaware of which cement had been injected. The time of biomaterial injection was referred as t = day 0.

Parameters

Gait parameters were acquired with the CatWalk 42-cm-long corridor. The compliant run criteria were 1) a run duration between 1 and 5 seconds and 2) a maximum allowed speed variation of 80%. Runs longer than 5.5 seconds were automatically aborted. Runs with backing, sniffing, cleaning, or long stops were also discarded during the acquisition phase by the investigator. Analysis of recorded runs provides 280 raw measurements. A minimum of 5 compliant runs was necessary for statistical analysis. In most cases, the first 5 or 6 runs produced the 5 compliant runs. The number of runs was limited to avoid exhausting the rats.

Based on the expected properties of the CPCs tested, the following parameters were studied:

- Print area (in cm^2) is the surface of the complete paw print during the stance phase. The stand phase (in seconds) is the duration of the contact between the paw and the glass plate (Fig 2B).
- Intensity (AU) is the mean intensity of the complete paw during the stand phase in the whole step cycle. The print intensity depends on the degree of contact between a paw and the glass plate. The intensity ranges from 0 to 255 and is converted to a color scale from green to red (Fig 2C).
- Manual print length (in cm) is the distance between the middle of the third toe and the heel of a paw during stance (Fig 2C).
- Duty cycle (in %) expresses the stance phase as a percentage of the step cycle. It is calculated according to the formula: stance/[stance + swing] $\times$ 100, where the stance is the duration of the contact between the paw and the glass plate and the swing is the duration in seconds of the no-contact phase of a paw with the glass plate (Fig 2D).

Variations in these parameters provided functional data related to the analgesic effects of the implanted cements and the expected benefits in pain relief.

Standard error of the mean (SEM) and histologic studies

Sample preparation

Once explanted, the distal ends of the implanted femurs were fixed in formalin. After this, the bone specimens (n = 18) were dehydrated with graded ethanol. They were then infiltrated and embedded in glycol methyl-methacrylate (GMMA, VWR International SAS, Fontenay sous Bois, France) obtained by mixing 90% purified methyl-methacrylate (VWR, Radnor, PA), 9% polyethylene glycol (VWR) and 1% benzoyl peroxide (Merck, Kenilworth, NJ). Polymerization was started with a mixture of N,N-dimethylaniline, 99% (Sigma-Aldrich) and propan-2-ol (Prolabo, France) at 4̄C for 1 week. The resulting resin blocks were then polished and cut into 2 pieces: one half of each sample was used for either SEM or histologic analysis.

SEM analysis

After polishing, the remaining bone-implant surfaces were coated with gold-palladium and femoral samples were observed by SEM (Leo 1450VP, Zeiss, magnification x50). Images were acquired with the back-scattered electron mode.[51] A 2-dimensional micro-architectural analysis was performed using Leica QWin Pro software. A bioactive zone (region of interest) was drawn manually in a ring-shape on the interface between the resorbed surface of the CPC and the concomitant new bone (Fig 3). The ring included the reactive part of the cement, which was seen as lighter compared to the inactive part, and the newly formed bone, which was seen as slightly darker gray compared with the old bone around it. The percentages of the newly formed bone surface in the total ring surface were then calculated after a manual grayscale thresholding for the elimination of pores from the surface calculus. The values were the then recalculated from square pixels to square micrometers.

Histologic studies

Undecalcified serial 7-μm sections of each sample were cut perpendicularly to the drilling axis of the

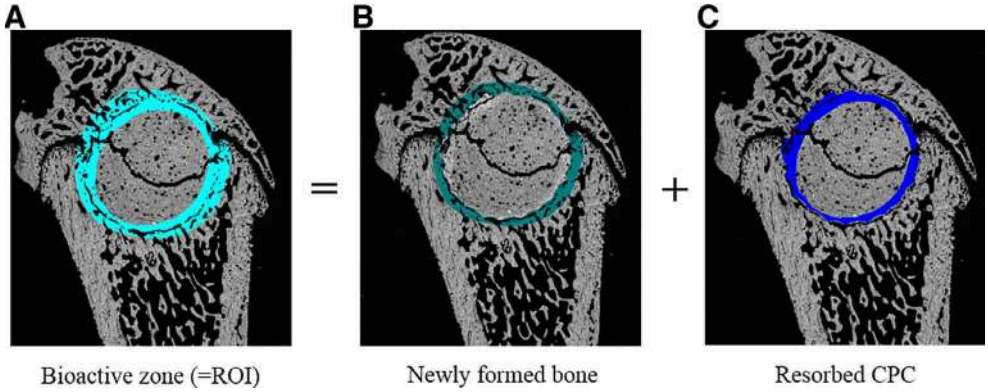


Figure 3. SEM images after femoral implantation. The ROI analyzed using Leica QWin Pro software corresponded to (A) a bioactive zone (lighter-blue area), which included (B) the newly formed bone (green area) and (C) the resorbed surface of the cement (blue area).

implantation area using a hard tissue microtome (Leica SM2500; Leica Biosystems Inc, Buffalo Grove, IL) equipped with a D-profile tungsten-carbide knife (Leïca). Movat's pentachrome and hematoxylin-eosin stains were performed on bone sections, which were then observed under a light microscope (Axioplan 2; ZEISS, Oberkochen, Germany). The Movat's pentachrome stain is bone-tissue specific and was used to distinguish mineral bone (yellow-green), osteoid tissue (red lines), soft tissue (light pink), and cement (blue).[49,51] The hematoxylin-eosin stain was used as a reference to analyze more specific tissue components. Each slice was scanned and observed using NDP.view2 software (Hamamatsu, Shizuoka Prefecture, Japan) for histological analysis.

Statistical analysis

For each animal, the mean (± SD) of the 5 compliant runs was calculated for the 4 selected parameters: print area, intensity, duty cycle, and manual print length. Mean values were then calculated for unloaded and loaded cements. Unloaded CPC and anesthetic-loaded CPC gait parameters were compared using analysis of variance (ANOVA) tests. When significant effects were found, the Fisher test was used for inter-groups comparisons. Each time we observed a significant difference between 2 groups, the associated F-test was checked to be positive. The threshold for significance was set at 99% ($P < .01$). SEM images were analyzed using the Kruskal-Wallis Test.

Results

Influence of anesthetics on cement properties

The addition of anesthetics did not significantly modify the setting reaction of the different cements. For the CPC-Bupi, the setting time was identical to the CPC (6.5−7.0 min range) without any change in the l/p ratio. Conversely, the setting time was shorter for the CPC-Ropi (4.0−4.5 min). The l/p ratio was then adjusted from 0.45 to 0.48 in order to have a similar setting time to the other cements. The new setting time was in the 6.0- to 6.5-minute range. Injectability was not significantly different among the 3 different cements (4.5 ± 1.5 N for the CPC and 5.2 ± 0.2 N and 4.3 ± 1.1 N for the CPC-Bupi and the CPC-Ropi, respectively). The association of both bupivacaine and ropivacaine led to a significant decrease in compressive strength from 25.5±1.2 MPa for CPC to 18.4 ± 0.1 MPa for the CPC-Bupi and 16.3 ± 1.6 MPa for the CPC-Ropi. For the CPC-Ropi, this was the direct consequence of a greater l/p ratio.

Anesthetic release kinetics

The linear correlation coefficient for UV measurement of both anesthetics was .999 at 262 nm. The release of drugs (Fig 4) was studied over several days (up to 11 days). First, an initial burst of approximately 44% and 30% of bupivacaine and ropivacaine, respectively, was released within the first hours (8 hours = .33 days). During the first 4 days, the CPC-Bupi released 72% of the drug, whereas the CPC-Ropi released 64% of the drug over the same period. At the end of the test (11 days), the cumulative drug release was about 74% and 70% for bupivacaine and ropivacaine, respectively.

Integrity of the analgesic drugs

The NMR (Supplementary Fig 1) and MS (Supplementary Fig 2) spectra indicated that the integrity of the released bupivacaine and ropivacaine was preserved.

Catwalk results

Before surgery, the animals presented a classic gait pattern with no significant difference between the print area and the print length of the right hind paw compared to the contralateral one. Mean preoperative values were 1.88 ± 0.03 cm^2 for print area, 115.28 ± 0.55 AU for intensity, 1.86 ± 0.02 cm for manual print length, and 66.34% ± 0.56% for duty cycle, and were considered as the reference baselines. After surgery, the animals were able to place their operated paw (right hind limb) in step cycles at any time of the experiment, and weight bearing on the operated limb was constant throughout the postoperative period.

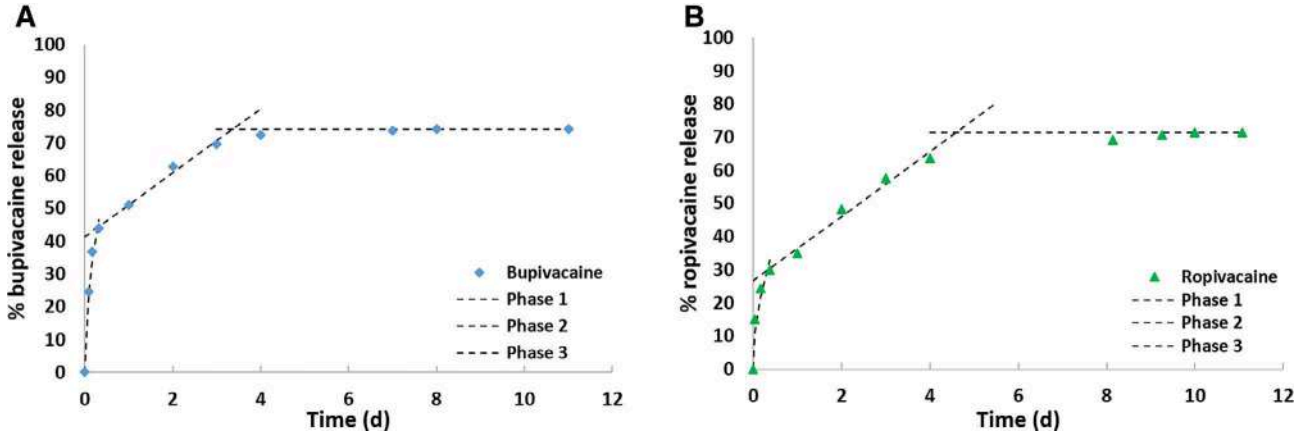


Figure 4. Release profiles from CPC loaded with (A) 8% bupivacaine and (B) 8% ropivacaine.

Figs 5A and 6A show the evolution of the print area parameter during the postoperative period. After implantation of unloaded cement, the print area decreased from 2.04 ± 0.07 cm^2 before surgery to a minimum of 0.66 ± 0.06 cm^2 at 24 hours postoperatively. The print area then increased gradually to 1.60±0.06 cm^2 at 14d. With both loaded cements, after an initial postoperative decrease, a faster return to the baseline value than for unloaded CPC at 14d was observed. At 24 hours postoperatively, gait modification reached its highest level for rats treated with the unloaded cement. It can be seen that the rats treated with both loaded cements had a significantly ($p<0.01$) higher print area than rats treated with the unloaded cement: 1.44±0.06cm^2 for bupivacaine and 1.10±0.06 cm^2 for ropivacaine. This can be seen in the footprint pictures of the operated rats according to the different implantation conditions (Fig 5B). Moreover, the two loaded CPCs can be differentiated at this point in time, with the CPC-Bupi showing a significantly higher print area. 48 hours postoperatively, it was still possible to differentiate significantly between the unloaded CPC and loaded CPCs. Finally at day 7 after surgery, the print area of rats implanted with the CPC-Bupi was not significantly different from the preoperative baseline.

The intensity parameter and the print area parameter displayed similar variation patterns. 24 hours after implantation (Fig 6B), the intensity decreased by 25% ± 2%, 9±2% and 1±2 % for CPC, CPC-Ropi and CPC-Bupi respectively compared with the baseline. The differences between the three cements were significant ($P < .01$). 48 hours after surgery; the CPC provided significantly lower intensity (79% ± 2%) than both loaded cements (96% ± 2% for CPC-Ropi and 98% ± 2% for CPC-Bupi). Interestingly, during the entire evaluation period the intensity provided by the CPC-Bupi was not significantly different from the preoperative reference baseline. At the end of the evaluation period (14 days after surgery), the intensity provided by CPC and CPC-Ropi returned to the baseline value and was no different from the preoperative baseline.

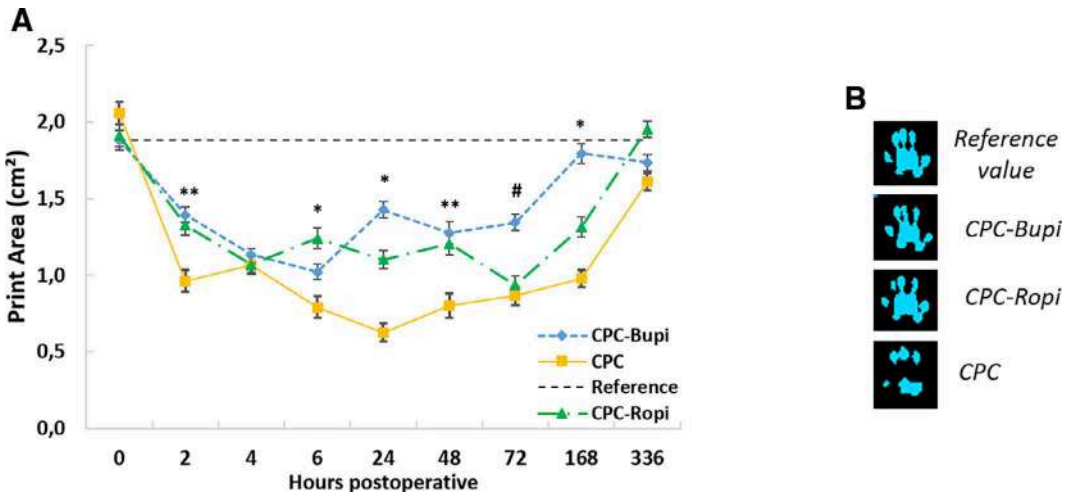


Figure 5. Print area (in cm^2) of the operated paw (right hind limb) for the 3 types of cements. CPC in yellow (plain line), CPC-Bupi in blue (dotted line), CPC-Ropi in green (dash-dotted line), and the reference preoperative baseline is the enlarged black dotted line. Statistical analysis used ANOVA with the Fisher test. The results are the means ± SD (N = 6), * $P < .01$ (CPC-Bupi vs CPC-Ropi vs CPC), ** $P < .01$ anesthetic loaded-CPCs vs CPC, # $P < .01$ CPC-Bupi vs others (A), print area pictures for each condition at 24 hours postoperative (B).

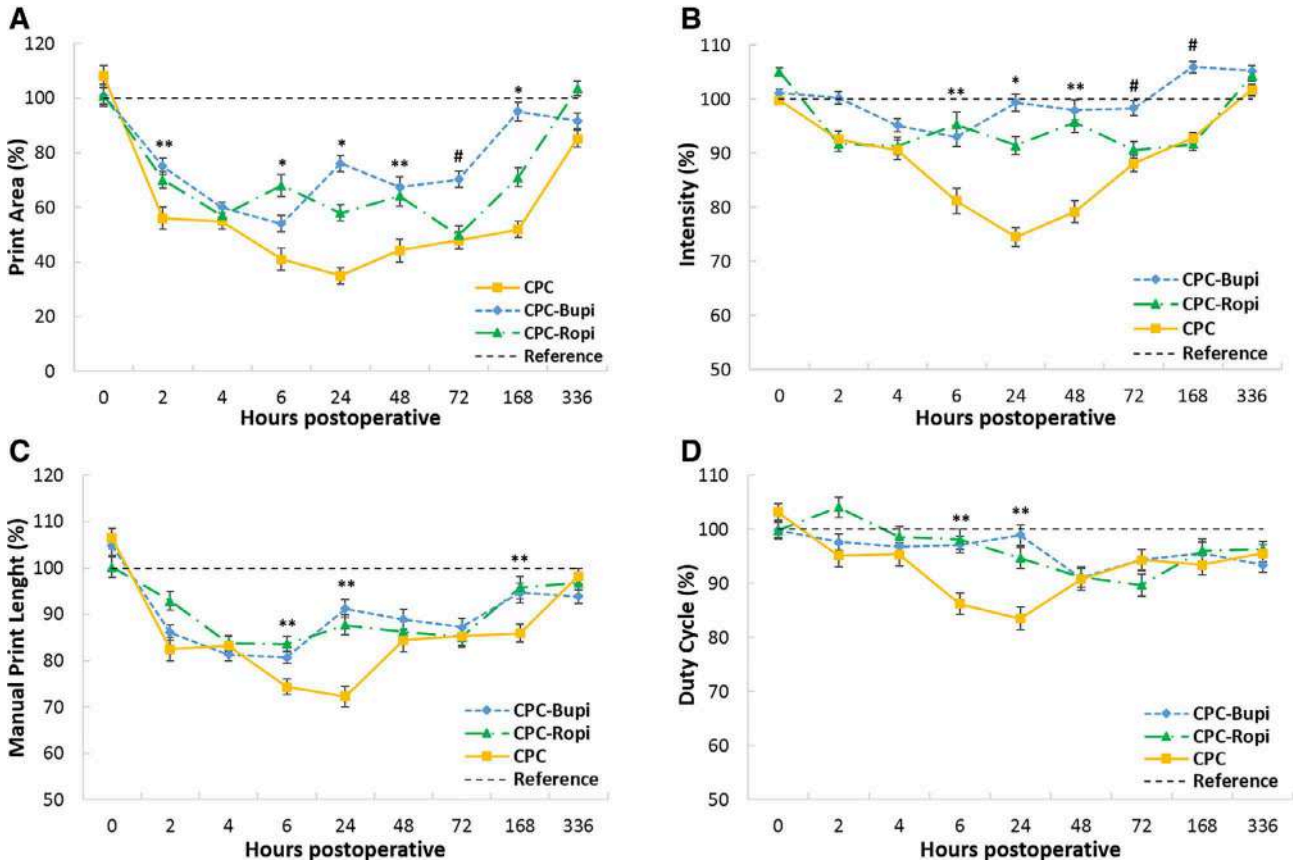


Figure 6. Four tested parameters for the 3 types of cements: print area in % of the preoperative baseline (A), intensity in % of the preoperative baseline (B), manual print length in % of the preoperative baseline (C), and duty cycle in % of the preoperative baseline (D). CPC in yellow (plain line), CPC-Bupi in blue (dotted line), CPC-Ropi in green (dash-dotted line), and the reference preoperative baseline is the enlarged black dotted line. Statistical analysis used ANOVA with the Fisher test. The results are the means ± SD (N = 6), * $P < .01$ (CPC-Bupi vs CPC-Ropi vs CPC), ** $P < .01$ anesthetic loaded-CPCs vs CPC, # $P < .01$ CPC-Bupi vs others.

Like the print area parameter, the manual print length was expected to decrease after surgery. Manual print length was 72% ± 2% at 24 hours (Fig 6C) for the CPC, whereas for CPC-Bupi and CPC-Ropi the manual print length was 91% ± 2% and 88% ± 2%, respectively. This difference was significant ($P < .01$) compared with the CPC but without any notable difference between the two loaded CPCs. At day 7 after surgery, the print length parameter was not found to be significantly different from the preoperative baseline for both loaded CPCs.

The duty cycle parameter (Fig 6D) did not exhibit significant variation throughout the entire implantation period, with no significant difference between the two loaded CPCs. Conversely, for CPC, the duty cycle decreased postoperatively and a significant difference ($P < .01$) between the unloaded cement (84% ± 2%) and the loaded CPCs (95% ± 2% for ropivacaine and 99% ± 2% for bupivacaine, respectively) was noted at 24 hours. At 48 hours after surgery, the duty cycle was not significantly different for all cements and progressively increased back to the reference value at 7 days after surgery.

SEM and histologic studies

Three weeks after implantation, the injected cements were still present in all implantation sites and new bone apposition was observed on the surface of each one of them (Fig 7A). As depicted in Fig 7B, the percentage of the newly formed bone was not significantly different between the 3 conditions. In accordance with this, osteoid tissue bordered by an osteoblast cell line was observed for all cements. The local release of the drugs did not modify the bone-cement interfaces and the osteointegration of both loaded CPCs as compared to the unloaded CPC. In addition, histological analysis did not reveal any adverse inflammatory reaction (Fig 8).

Discussion

Pain caused by bone harvesting for reconstruction is regarded as one of the major complications after autologous bone grafting procedures.[15,24,28,36,37,42,53,54] Multimodal analgesia appears to be the best method to limit postoperative pain and its evolution to chronicity. It includes peripheral nerve blocks through locoregional analgesia and systemic administration of analgesic drugs.[3,8,43]

CPCs are considered to be gold standard materials for new therapeutic approaches such as percutaneous or minimally-invasive techniques. These biomaterials are better suited to the shape of a bone defect than granules[22,23] and thanks to their moldability, they can fit

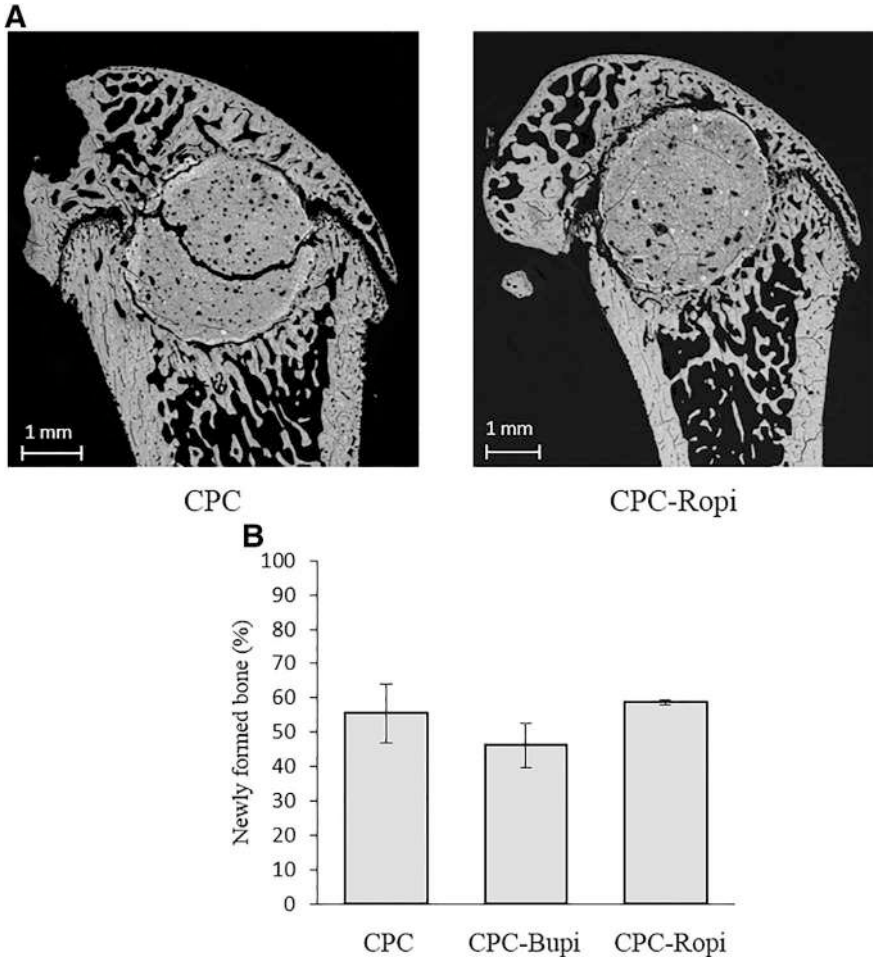


Figure 7. A. SEM images after femoral implantation. B. Results were expressed as the percentage of the newly formed bone relative to the ROI.

perfectly into implantation sites, thus optimizing bone-biomaterial contact in geometrically complex bone defects. Moreover, CPCs are based on a mixture of CaP mineral compounds that react together to provide a material that hardens in situ after injection, through a nonexothermic reaction in contrast to PMMA cements. The association of CaP bone cements with bioactive molecules has been investigated for 3 major clinical purposes in the bone environment: the local delivery of antibiotics, the promotion of osteointegration or bone augmentation by the release of growth factors or cytokines, and the prevention of further bone resorption by the incorporation and subsequent in vivo release of antiresorptive agents such as bisphosphonates.[49] In this study, it was possible to incorporate local anesthetics into CPCs to propose them as suitable candidates for pain management after bone surgery. Such bone substitutes, which can both fill the harvest site and deliver an analgesic substance in situ, could constitute a novel therapeutic approach.

The effectiveness of the analgesia and the resulting functional recovery needed to be evaluated as objectively as possible. In this study, the CatWalk automated quantitative gait analysis system was deemed to be the best method. It provided a functional assessment of the pain relief provided by injecting CPC loaded with 2 different analgesic drugs, bupivacaine and ropivacaine, and compared with the pain relief obtained with the cement alone. Reproducible and objective gait analysis data were obtained in an animal model that mimics the clinical situation. In vivo studies in rats have been widely used to evaluate both bone reconstruction ability of CaP bone substitutes[4,7,12] and neurologic and orthopedic pain,[34,35] with the Von Frey monofilament test being the most commonly used method to evaluate mechanical allodynia in rats. Several articles[6,52] have discussed the difference between the Von Frey monofilament method and the CatWalk system. It appears that the major drawback of the Von Frey method is the difficulty in establishing a correct threshold. Moreover, the force of the filament is influenced by ambient humidity and temperature. In addition, animals are tested under restrictive conditions that are very different from physiological gait conditions. Conversely, the Catwalk system allows the animals to walk freely, which minimizes handling and reduces confounding stress factors. Moreover, it provides an objective, non-invasive analysis for investigating a large number of gait parameters. In this study, changes in the gait and gait expression parameters in the operated rats were induced by surgical pain and shown by either a reluctance or an inability to use the operated limb.

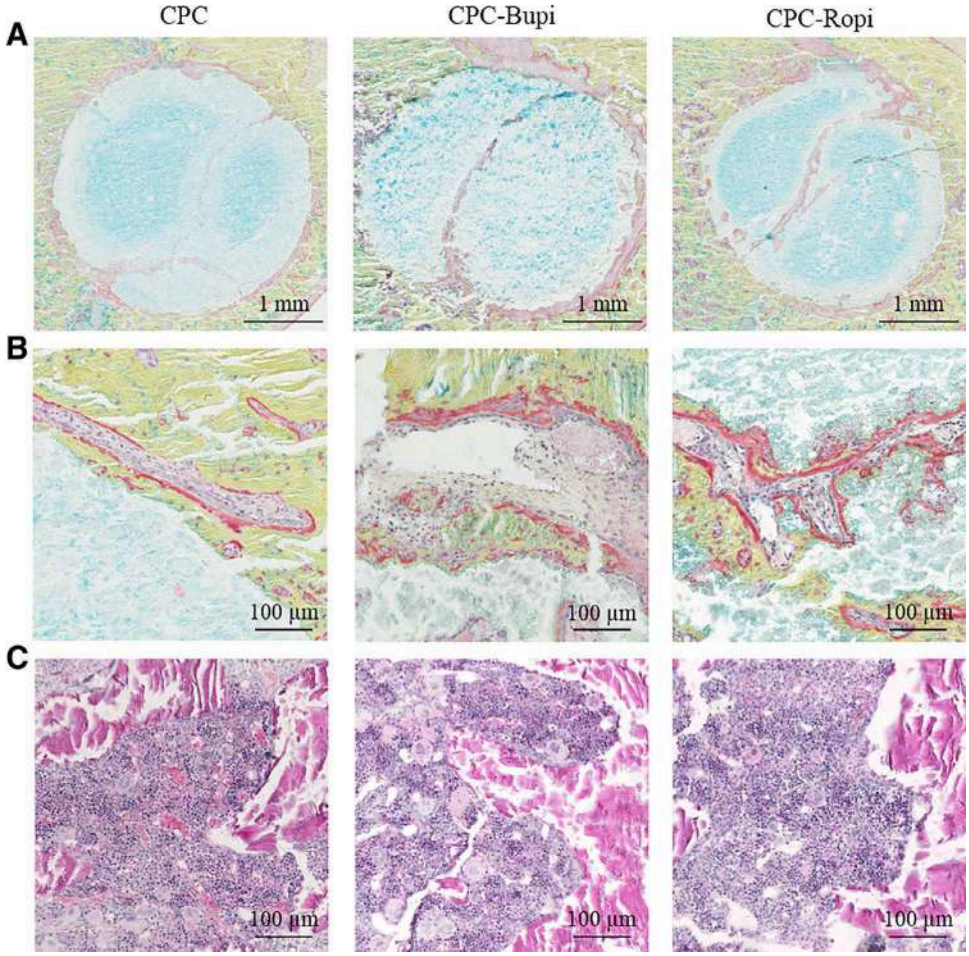


Figure 8. Histological analysis of femoral samples 3 weeks after implantation. A. Observation of the whole cement after implantation with Movat's stain (blue = cement; yellow-green = bone, light pink = soft tissue). B. Detailed images of the new bone formation from Movat's stain (red line = osteoid tissue, purple line: osteoblast cell line). C. Bone marrow observation from hematoxylin-eosin stain.

Gait analysis and functional recovery

The chosen parameters were of great interest because they concerned both spatial (print area, manual print length) intensity, and temporal (duty cycle) data. Catwalk gait analysis showed that all these parameters decreased after surgery. Rats treated with the unloaded cement exhibited the highest level of pain at 24 hours after surgery, as shown by the significant decrease observed on all tested parameters compared with preoperative baselines. However, implantation of analgesic drug-loaded cements provided a clear and continuous improvement of the postoperative gait, especially during the short-term postoperative period. Due to the significant difference among CPC-Bupi, CPC-Ropi, and the CPC observed at 24 hours, the print area and intensity parameters revealed simple and reliable criteria to evaluate the postoperative weight-bearing ability and functional recovery of the operated rats. These 2 parameters reflected the induced postoperative pain by the fact that the animals became reluctant or unable to support weight-bearing pressure on their operated paw, and the postoperative functional benefits provided by the implantation of analgesic CPCs.

During the short-term postoperative period, the study of the duty cycle of the implanted hind limb revealed a decrease in the paw-floor contact (stance duration) associated with an increase in the swing duration. Reduced manual print length was directly related to the decrease in the print area. Moreover, the manual print length and duty cycle parameters were not significantly different between the 2 loaded CPCs, but still significantly different compared to the unloaded cement, emphasizing the ability to contrast the analgesic effect compared to the unloaded cement. Although both CPC-Bupi and CPC-Ropi displayed similar pain relief benefits at 24 and 48 hours postoperative, CPC-Bupi seemed to provide an earlier and more complete return to preoperative baselines than CPC-Ropi, in accordance with the compared pharmacokinetic properties and the respective efficiency of these 2 drugs.[13]

During surgery, for ethical and medical reasons, buprenorphine hydrochloride was administered subcutaneously as preemptive analgesia. This drug has a longer duration of action than morphine (up to 6 hours [17]). The long-acting effect of the perioperative analgesia could have influenced the results obtained during the early stages of Catwalk assessment. However, all the surgical procedures and gait analyses were performed blindly to increase the reliability of the results obtained.

Release of the drug during the critical period

Modifications to the setting reaction kinetics along with the mechanical and rheological properties of loaded-CPCs could impact their future clinical performance. The objective of this study was to provide and validate a new approach to decrease the risk of developing chronic pain after iliac crest autologous bone grafting involving the use of an original drug-biomaterial combination device that can provide significant pain relief during the first 3 to 4 postoperative days.

In this study, the release profile of the 2 tested drugs consisted of 3 successive phases, as shown in Fig 4:

1. An initial burst in which approximately 44% and 30% of the drugs (bupivacaine and ropivacaine, respectively) were released within the first 8 hours. According to the literature,[23,33,45] this release corresponds to the penetration of sodium chloride aqueous solution into the cement and follows the Higuchi model.
2. After this initial massive release, a linear drug release was observed from 8 hours to 4 days, with a release rate of 9.7% per day for the 2 different cements.
3. Finally, during the third stage, the release rate slowed considerably, and the drug release reached a plateau (4 and 5 days for bupivacaine and ropivacaine, respectively).

These in vitro results showed an efficient release from the 2 loaded cements during the first 3 to 4 postoperative days, in contrast to a previous study[48] in which bupivacaine-loaded CDA granules were characterized by a burst release of the drug (80% within 5 h). The choice of a CPC as drug delivery system appears to be of considerable interest to control the progressive release of the drugs and thus the duration of the analgesic effect during the most critical period. It could therefore be possible to include these kinds of loaded CPCs into the multimodal analgesia protocol to fill the donor site in autologous iliac bone grafting procedures.

Biologic response to loaded-CPC implantation

Considering the cardiotoxicity and vasodilatory effects of bupivacaine,[11] both the local tolerance and safety of loaded CPCs had to be documented in situ. A preliminary in vivo safety study (ie, femoral implantation in rabbits) was conducted over 8 weeks (unpublished work). Briefly, plasma assays were performed at successive times following in vivo implantation. Bupivacaine was under the detectability threshold in all samples (<100 ng/mL). To summarize, these unpublished preliminary data demonstrated the absence of systemic passage, strongly suggesting that this loaded cement displayed a good safety profile. In addition, monitoring of cardiovascular function revealed no adverse effects from the time of femoral implantation until the animals were sacrificed.

In this study, histologic analysis showed that local release of bupivacaine or ropivacaine from the 2 tested cements did not generate any adverse bone tissue reaction. Furthermore, the loaded CPCs retained their biological properties and their bone healing and bone filling ability due to their bioactive, osteoconductive, and injectability properties.[2,38,39] Moreover, by extrapolating the drug release profile and the volume of cement implanted, no dysfunctions were expected. No neurological problems such as skin damage or self-trauma, and no dysfunction such as recurrent non weight-bearing lameness or muscle atrophy that could have been attributed to local side-effects were observed in the rats, regardless the time of implantation. These data are of major interest as part of multimodal analgesia in orthopedic and fracture management surgery.

Conclusion

To our knowledge, this is the first time that the CatWalk system was used to evaluate the pain relief provided by the implantation of bone substitutes loaded with analgesic drugs. This appeared to be an appropriate method to study functional recovery after a bone harvesting procedure followed by filling the bone defect created with an analgesic-loaded biomaterial. The method demonstrated and differentiated the potential analgesic effects produced by the carrier alone and by the eluted drug. In addition, this preliminary in vivo study showed that the injectable cements were well tolerated and supported controlled release of local anesthetic over the course of several days (up to 2 weeks). Moreover, these new cements demonstrated the properties required for use in preclinical studies and in a global pain management protocol after bone surgery.

Acknowledgements

The authors thank Graftys SA for supplying the calcium phosphate cement samples and Dr. C. Mellier and Ms. M. Le Ferrec for their valuable advice. We strongly thank the whole SC3M platform and especially Paul Pilet for his technical expertise of SEM analysis.

Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.04.014.

References

1. ASTM: Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. ASTM C266-08, 2008.

2. Bajammal SS, Zlowodzki M, Lelwica A, Tornetta P, Einhorn TA, Buckley R, Leighton R, Russell TA, Larsson S, Bhandari M: The Use of Calcium Phosphate Bone Cement in Fracture Treatment: A Meta-Analysis of Randomized Trials. J Bone Jt Surg-Am Vol 90:1186-1196, 2008

3. Banks A: Innovations in postoperative pain management: continuous infusion of local anesthetics. AORN J 85:904-914; quiz 915-18, 2007

4. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 12:1-21, 1995

5. Beaussier M: Frequency, intensity, development and repercussions of postoperative pain as a function of the type of surgery. Ann Fr Anesth Reanim 17:471-493, 1998

6. Berryman ER, Harris RL, Moalli M, Bagi CM: Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. J Musculoskelet Neuronal Interact 9:89-98, 2009

7. Beyreuther B, Callizot N, Stöhr T: Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. Arthritis Res Ther 9:R14, 2007

8. Bigby J, Reader A, Nusstein J, Beck M, Weaver J: Articaine for supplemental intraosseous anesthesia in patients with irreversible pulpitis. J Endod 32:1044-1047, 2006

9. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE: Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. Biomaterials 26:6423-6429, 2005

10. Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E: Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. Acta Biomater 53:1-12, 2017

11. Bourne E, Wright C, Royse C: A review of local anesthetic cardiotoxicity and treatment with lipid emulsion. Local and Regional Anesthesia 3:11-19, 2010

12. Buerkle H, Schäpsmeier M, Bantel C, Marcus MA, Wüsten R, Van Aken H: Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. Br J Anaesth 83:436-441, 1999

13. Casati A, Putzu M: Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different? Best Pract Res Clin Anaesthesiol 19:247-268, 2005

14. Chen Y-J, Cheng F-C, Sheu M-L, Su H-L, Chen C-J, Sheehan J: Pan H-C: Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system. J Neuroengineering Rehabil 11:1, 2014

15. Chung F, Ritchie E, Su J: Postoperative pain in ambulatory surgery. Anesth Analg 85:808-816, 1997

16. Coulthard P, Pleuvry BJ, Brewster M, Wilson KL, Macfarlane TV: Gait analysis as an objective measure in a chronic pain model. J Neurosci Methods 116:197-213, 2002

17. Curtin LI, Grakowsky JA, Suarez M, Thompson AC, DiPirro JM, Martin LBE, Kristal MB: Evaluation of buprenorphine in a postoperative pain model in rats. Comp Med 59:60-71, 2009

18. Deumens R, Jaken RJP, Marcus MAE, Joosten EAJ: The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. J Neurosci Methods 164:120-130, 2007

19. Ferland CE, Laverty S, Beaudry F, Vachon P: Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. Pharmacol Biochem Behav 97:603-610, 2011

20. Gabriel AF, Marcus MAE, Honig WMM, Walenkamp GHIM, Joosten EAJ: The CatWalk method: A detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. J Neurosci Methods 163:9-16, 2007

21. Geusens P, Emans PJ, de Jong JJA, van den Bergh J: NSAIDs and fracture healing. Curr Opin Rheumatol 25:524-531, 2013

22. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G: New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. Acta Biomater 6:2863-2873, 2010

23. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA: Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. J Controlled Release 113:102-110, 2006

24. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML: Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. Clin Orthop 339:76-81, 1997

25. Hamers FPT, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispen WH: Automated Quantitative Gait Analysis During Overground Locomotion in the Rat: Its Application to Spinal Cord Contusion and Transection Injuries. J Neurotrauma 18:187-201, 2001

26. Koopmans GC, Deumens R, Brook G, Gerver J, Honig WMM, Hamers FPT, Joosten EAJ: Strain and locomotor speed affect over-ground locomotion in intact rats. Physiol Behav 92:993-1001, 2007

27. Lankhorst AJ, ter Laak MP, van Laar TJ, van Meeteren NLU, de Groot JCMJ, Schrama LH, Hamers FPT, Gispen W-H: Effects of Enriched Housing on Functional Recovery After Spinal Cord Contusive Injury in the Adult Rat. J Neurotrauma 18:203-215, 2001

28. Maharaj MM, Phan K, Mobbs RJ: Anterior cervical discectomy and fusion (ACDF) autograft versus graft substitutes: what do patients prefer?—A clinical study. J Spine Surg 2:105-110, 2016

29. Massart R, Dymov S, Millecamps M, Suderman M, Gregoire S, Koenigs K, Alvarado S, Tajerian M, Stone LS, Szyf M: Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells. Sci Rep 6:19615, 2016

30. Mellier C, Fayon F, Boukhechba F, Verron E, LeFerrec M, Montavon G, Lesoeur J, Schnitzler V, Massiot D, Janvier P, Gauthier O, Bouler J-M, Bujoli B: Design and properties of novel gallium-doped injectable apatitic cements. Acta Biomater 24:322-332, 2015

31. Miyagi M, Ishikawa T, Kamoda H, Orita S, Kuniyoshi K, Ochiai N, Kishida S, Nakamura J, Eguchi Y, Arai G, Suzuki M, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Inoue G, Ohtori S: Assessment of Gait in a Rat Model of Myofascial Inflammation Using the CatWalk System: Spine 36:1760-1764, 2011

32. KÄ Möller, O-G Berge, Hamers FPT: Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and rofecoxib. J Neurosci Methods 174:1-9, 2008

33. Noukrati H, Cazalbou S, Demnati I, Rey C, Barroug A, Combes C: Injectability, microstructure and release properties of sodium fusidate-loaded apatitic cement as a local drug-delivery system. Mater Sci Eng C 59:177-184, 2016

34. Peter B, Gauthier O, Laïb S, Bujoli B, Guicheux J, Janvier P, van Lenthe GH, Müller R, Zambelli P-Y, Bouler J-M, Pioletti DP: Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. J Biomed Mater Res A 76:133-143, 2006

35. Peter B, Pioletti DP, Laïb S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli P-Y, Bouler J-M, Gauthier O: Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. Bone 36:52-60, 2005

36. Pollock R, Alcelik I, Bhatia C, Chuter G, Lingutla K, Budithi C, Krishna M: Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. Eur Spine J 17:845-852, 2008

37. Rasche S, Koch T: [Regional anaesthesia versus general anaesthesia-pathophysiology and clinical implications]. Anaesthesiol Reanim 29:30-38, 2004

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

39. Russell TA, Leighton RK: Comparison of Autogenous Bone Graft and Endothermic Calcium Phosphate Cement for Defect Augmentation in Tibial Plateau Fractures: A Multicenter, Prospective, Randomized Study. J Bone Jt Surg-Am Vol 90:2057-2061, 2008

40. Scheiman JM: NSAID-induced Gastrointestinal Injury: A Focused Update for Clinicians. J Clin Gastroenterol 50:5-10, 2016

41. Schobelock MJ: Pain management: engineering successful outcomes. J Healthc Mater Manage 10:61-66, 1992

42. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, Albert TJ: Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. Spine 28:134-139, 2003

43. Singh K, An HS, Samartzis D, Nassr A, Provus J, Hickey M, Andersson GBJ: A prospective cohort analysis of adjacent vertebral body bone mineral density in lumbar surgery patients with or without instrumented posterolateral fusion: a 9- to 12-year follow-up. Spine 30:1750-1755, 2005

44. Smith G: Pain after surgery. Br J Anaesth 67:233-234, 1991

45. Tung I-C: In vitro drug release of antibiotic-loaded porous hydroxyapatite cement. Artif Cells Blood Substit Biotechnol 23:81-88, 1995

46. Vandeputte C, Taymans J-M, Casteels C, Coun F, Ni Y, Van Laere K, Baekelandt V: Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. BMC Neurosci 11:1, 2010

47. Verron E, Bouler JM, Guicheux J: Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs. Acta Biomater 8:3541-3551, 2012

48. Verron E, Gauthier O, Janvier P, Le Guen H Holopherne D, Cavagna R, Bouler J-M: Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 94:89-96, 2010

49. Verron E, Gauthier O, Janvier P, Pilet P, Lesoeur J, Bujoli B, Guicheux J, Bouler J-M: In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite. Biomaterials 31:7776-7784, 2010

50. Verron E, Khairoun I, Guicheux J, Bouler J-M: Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. Drug Discov Today 15:547-552, 2010

51. Verron E, Pissonnier M-L, Lesoeur J, Schnitzler V, Fellah BH, Pascal-Moussellard H, Pilet P, Gauthier O, Bouler J-M: Vertebroplasty using bisphosphonate-loaded calcium phosphate cement in a standardized vertebral body bone defect in an osteoporotic sheep model. Acta Biomater 10:4887-4895, 2014

52. Vrinten DH, Hamers FF: 'CatWalk'automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. Pain 102:203-209, 2003

53. Wilder-Smith OH, Arendt-Nielsen L: Postoperative HyperalgesiaIts Clinical Importance and Relevance. J Am Soc Anesthesiol 104:601-607, 2006

54. Zaslansky R, Eisenberg E, Peskin B, Sprecher E, Reis DN, Zinman C, Brill S: Early administration of oral morphine to orthopedic patients after surgery. J Opioid Manag 2:88-92, 2006

55. Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancret F, Bouler J-M: Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties. Acta Biomater 10:1035-1049, 2014

Delivery systems of local anesthetics in bone surgery: are they efficient and safe?

Manon Dupleichs[1,2,‡], Qiman Gao[3,‡], Zahi Badran[2,3], Pascal Janvier[1], Jean-Michel Bouler[1], Olivier Gauthier[2,4], Faleh Tamimi[3] and Elise Verron[1,5]

[1] CEISAM, CNRS UMR 6230, University of Nantes, Nantes, France
[2] RMeS-lab, INSERM UMR 1229, University of Nantes, Nantes, France
[3] Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Canada
[4] ONIRIS, Nantes Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, France
[5] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Nantes, Nantes, France

Management of postoperative pain following bone surgery includes administration of local anesthetics (LAs). Smart delivery systems, including triggered systems, have been designed to provide a continuous release of LA *in situ*. However, these systems can provide a high level of LA locally. This review will examine the state-of-the-art regarding the LA delivery systems optimized for management of postoperative pain in bone surgery and will discuss the potential adverse effects of LAs on the overall pathways of bone healing, including the inflammation response phase, hemostasis phase, tissue repair phase and remodeling phase. There is a clinical need to document these effects and the potential impacts on the clinical outcome of the patient.

Introduction

Postoperative pain following bone surgery is a frequent concern. The severe pain caused by surgical interventions involving hard tissues can jeopardize treatment success, and compromise patient recovery, mobility, function, quality-of-life and autonomy, as well as prolonging hospitalization [1,2]. This postoperative pain can become chronic and therefore more difficult to manage. There is a potential connection between pain, inflammation and the healing process after bone surgery through the immune system. Consequently, pain management during the first four postoperative days should be as efficient as possible to minimize the risk of developing chronic pain and thus compromising the healing process.

Postoperative pain after bone surgery is usually managed with systemic administration of conventional analgesics such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids [3]. In addition to adverse effects induced by analgesics, their prescriptions increase the overall intervention costs, thus adding an economic burden on health system expenses [4]. In contrast to this systemic approach, local analgesia through peripheral nerve blocks is very promising because it can limit postoperative pain while avoiding complications and limitations of systemic drugs [5,6]. Unfortunately, therapeutic efficacy is largely compromised by a short effective duration. For this reason, delivery systems of local anesthetics (LAs) have been developed to achieve continuous analgesia.

Management of postoperative pain with local anesthetic drugs

Since the introduction of cocaine, various LAs have been adopted in clinical practice to manage postoperative pain [7,8]. Although binding to the sodium channel through the hydrophilic pathway is the main mechanism of action of LAs [9], alternative pathways described for uncharged LA (e.g., benzocaine) or, by contrast, for permanently charged LA (e.g., lidocaine derivative QX-314) also exist [10]. Uncharged LA can pass through the nerve membrane and reach the lateral fenestrations in the sodium channel. By contrast, influx of QX-314 seems facilitated by the formation of

Corresponding author:
‡ These authors contributed equally to this work.

1359-6446/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.
https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.06.019

TABLE 1

Physical, chemical and pharmacokinetic properties of the main LAs used in a clinical setting (amino-ester and amino-amide) [9]

		Physical-chemical			Pharmacokinetics				
		ionization constants (onset)	lipid solubility (potency)	protein binding (duration)					
	Drug	*pKa*	*O/B PQ*[a]	*PB %*	*MW (g/mol)*	*$t_{1/2}$ (h)*	*Clinical duration*	*Max. dose (mg/kg)*	*With Epi-*
Ester	Benzocaine				165				
	Cocaine	8.7 (slow)	(moderate)		303		0.5–1	3	?
	Chloroprocaine	8	(moderate)	(short)	271		0.5–1	11	14
	Procaine	8.9 (slow)	1.7 (weak)	6 (short)	236	0.1	0.5–1	12	?
	Tetracaine	8.5 (slow)	221	76	264		1.5–6	3	?
Amide	Articaine	7.8 (fast)	17 (moderate)	70 (short)	321	0.1		4	7
	Bupivacaine	8.1 (slow)	346 (potent)	95 (long)	288	3.5	1.5–8	2.5	3
	Lidocaine	7.9 (fast)	2.4 (moderate)?	64 (moderate)	234	1.6	0.75–1.5	4.5	7
	Mepivacaine	7.6 (fast)	21 (moderate)	77 (moderate)	246	1	1–2	4.5	7
	Prilocaine	7.9 (fast)	25 (weak)?	55 (moderate)	220	1.6	0.5–1	5–7	7–8.5
	Ropivacaine	8.1 (slow)	115 (potent)	94 (long)	274	1.9	1.5–8	3	3.5

Abbreviations: PB, protein binding; MW, mass weight.
[a] Partition coefficients were measured between oil and buffer (O/B) at pH 7.4 and 25 °C.

a large pore in response to stimulation of the transient receptor potential vanilloid 1. Table 1 summarizes physical–chemical and pharmacokinetic characteristics involved in the LA activity [9].

Unfortunately, therapeutic efficacy is largely compromised by a short duration of action (Table 1). To overcome this limitation, continuous and controlled administration of LA at surgical sites or around nerves that innervate the site is often used by surgeons. This local administration can extend analgesia to better prevent chronic pain with limited systemic effects. For example, femoral nerve block (FNB) has been shown to (i) reduce the postoperative need for opioids after total knee arthroplasty (TKA), (ii) reduce hospital stays of patients and (iii) increase ability to undergo physical therapy compared with patients receiving oral analgesia postoperatively. However, this technique can be associated with a risk of decreased muscle tone of the quadriceps, which counteracts effective rehabilitation and increases the risk of patient falls [11]. Local infiltration analgesia (LIA) is an alternative regional anesthesia method for the control of acute postoperative pain following knee and hip replacement surgery. Patients who received local periarticular injection of ropivacaine, ketorolac and epinephrine showed lower pain levels as compared with those who received FNB [12].

Despite these clinical benefits, the efficacy of LAs is still limited by the short duration of analgesia. With a view to prolonging LA duration without compromising patient safety, different options have been envisaged including drug delivery systems, structural modification of LA molecules and coadministration of vasoconstrictors. Among them, prolonged-release formulations of LA using biocompatible drug carriers (Table 2) have been designed to remain at the site of injection and release LA slowly over time at a therapeutic dose. These systems should be easily and simply administered to patients.

TABLE 2

Description of characteristics required for a LA delivery system

Clinical efficacy	Protection of local anesthetic (LA)
	Solubilization of LA
	Sustained release of LA
	Prolonged duration of nerve block
	Favorable ratio of sensory and motor blocks
Safety	Biocompatible
	Biodegradable
	Avoiding high local level of LA
	Minimal local inflammation response
	Absence of neurotoxicity
	Absence of myotoxicity
	No systemic toxicity
	Stability of formulation
Administration formalities	Easy to administer to patients
	Initiated by a single administration
	No need of general anesthesia or surgical procedure
	No need of sophisticated materials
Manufacturing process	Cost effective
	Easy to produce
	Industrial scale-up

Formulation for optimized delivery of local anesthetics

Polymers

Hydrophobic polymers such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and PEG–polylactic acid (PELA) have been used to produce particles for controlled release of LA. Release profile can be optimized by varying the size of particles, drug content, polymer:drug ratio and excipient used. Administration of PLGA microspheres significantly prolongs the release of bupivacaine to 144 h, whereas plasma levels of bupivacaine were undetected 8 h after injection of bupivacaine solution [13]. Qi *et al.* [14] investigated the analgesic effect of ropivacaine–PELA nanoparticles (10% w/w) on a postoperative pain model in rats. These nanoparticles increased the duration of sciatic nerve block over 3 days after a single administration, whereas systemic injection of ropivacaine was only effective for 8 h. This prolonged release could result in long-lasting local exposure of the nerve to ropivacaine with the metabolism of the PELA nanoparticles.

Recently, lipid–polymer hybrid nanoparticles (LPNs) have also been used to regulate the release of bupivacaine [15]. LPNs consist of two major components: (i) the PLGA core capable of encapsulating hydrophilic and hydrophobic drugs; and (ii) single or multiple lipid

layers (lecithin). By combining the characteristics of polymeric nanoparticles and lipids, LPNs provide high structural integrity, stability during storage and prevent the fast release of the drugs. Indeed, prolonged controlled release of bupivacaine from LPNs was observed for up to 96 h with only 19.3 ± 3.6% of the drug released at 10 h compared with 50.7 ± 3.1% of release at 10 h obtained with bupivacaine-loaded PLGA nanoparticles. Electrical stimulation on mice showed these LPNs increased the duration of analgesia by 5 h compared with bupivacaine-loaded PLGA nanoparticles.

Interestingly, chitosan (CS) has been included in LPN formulations to create a strong crosslinking complex of CS resulting in denser particles that can delay lidocaine release [16]. As expected, its release was slower than that of the liposomal formulation. The release profile exhibits a biphasic pattern characterized by an initial burst-release of ~40% of the lidocaine in 8 h followed by sustained release up to 72 h (vs 48 h for liposomes). This slower release of lidocaine results from its entrapment by the lipid matrix.

Liposomes

A liposomal bupivacaine formulation (Exparel®) was recently approved by the FDA in 2011 for postsurgical analgesia. Briefly, this multivesicular liposome contains a novel phospholipid excipient, dierucoylphosphatidylcholine, cholesterol and tricaprylin, which allows a particularly high capacity for bupivacaine loading (fivefold ratio compared with conventional preparations). After its injection into trochanter in rats, sciatic nerve block lasted 240 min as compared with 120 min for 0.5% (w/v) bupivacaine HCl and 210 min for 1.31% (w/v) bupivacaine HCl [17]. A Phase II dose-ranging study on patients with TKA reported that a 532 mg dose extended the duration of local analgesia from under 12 h to 5 days. This therapeutic dose was well-tolerated, had a higher safety margin and showed a favorable safety profile compared with bupivacaine and control groups [18].

To date, several randomized clinical trials have shown that liposome bupivacaine periarticular injection can provide better postoperative analgesia compared with placebo or plain bupivacaine by periarticular injection or nerve block [19,20]. Liposome bupivacaine can reduce pain score and opioid analgesia consumption and shorten hospitalization in patients who underwent TKA [21]. It might be able to improve postoperative physical performance of walking and stairclimbing, to reduce hospitalization cost and speed up postoperative recovery in TKA [22]. Recently, co-injection of liposomal bupivacaine with a co-delivery of two encapsulated adjuvant compounds, dexamethasone and dexmedetomidine, has been shown to enhance the duration of sciatic nerve block 2.9-times more than liposomal bupivacaine alone [23].

Currently, published data are still insufficient to establish a well-conducted comparison between liposome bupivacaine and various mixtures of non-opioid analgesia. Indeed, there is not enough evidence to support whether liposome bupivacaine is superior to a standard analgesic mixture, considering the aspects of pain relief, opioid consumption and hospital stay. Although liposomes have excellent properties for drug delivery, their use remains compromised by physical instabilities (size increase by vesicle fusion) and chemical instabilities (lipid peroxidation) during storage limiting their shelf life, sterilization and industrial scale-up.

Calcium phosphate bone substitutes

Calcium phosphate (CaP) biomaterials are extensively used for bone reconstructive surgery because they are biocompatible, bioactive and osteoconductive [24]. Interestingly, they can act as local drug delivery systems [25,26]. The first combination of CaP with bupivacaine provided a dose-dependent analgesic effect during the first postoperative days [27]. Lidocaine has been mixed with different kinds of CaP cement (CPC) components. The drug release depends on cement pH and composition and can be prolonged for up to 6 days [28]. Salts of lidocaine, bupivacaine and levobupivacaine were incorporated into the solid phase of CPC [29]. Cement released >60% of the lidocaine within the first 24 h, whereas bupivaine or levobupivacaine reached 60% release after 144 h of incubation. Recently, a critical-size bone defect of rat femur was filled by an injectable CPC loaded with bupivacaine or ropivacaine [30]. The functional evaluation of the gait performed with the CatWalk system demonstrated significant pain relief during the short-term postoperative period.

Smart controlled systems

In the era of personalized medicine, LA delivery systems should achieve responsive and adjustable release according to the changing needs of patients in terms of timing, intensity and duration of analgesia. In this attempt, three leading-edge external triggers have been conceived based on light, ultrasound and magnetic fields and could be placed on a nerve allowing the patient to achieve precise titration of LA [31]. Because tissue penetration by light is dependent on its wavelength and power, relatively deep light penetration of tissue should be expected at near infrared (NIR) wavelengths (650–900 nm) up to 10 cm. Following irradiation, gold nanorods (GNRs) incorporated within liposomes can convert light energy to heat resulting in a phase transition of the lipid bilayer or pressure fluctuations that disrupt the lipid membrane. Subsequently, the ordered gel phase is transformed into a disordered liquid crystalline phase allowing the release of LA contained within the liposomes. After their implantation into a rat hind paw, irradiation with NIR light (808 nm) induced repeated infiltration analgesia [32]. Interestingly, varying the irradiance and duration of irradiation can modulate the analgesic effect. However, NIR light can be significantly attenuated with progressive depth and increasing irradiance can induce severe tissue injury. Consequently, the formulation has been modified to render liposomes more sensitive to low temperatures [33]. In fact, this new formulation was sensitive to low irradiance over short durations (1–2 min), which would be ideal to relieve pain as quickly as possible.

A photosensitizer contained inside liposomes produced singlet oxygen upon irradiation with NIR light resulting in peroxidation of unsaturated lipids in the liposome bilayer. Consequently, liposomes became more permeable and released encapsulated LA [34]. *In vitro* release of LA reached ~6% in response to NIR irradiation. Injection of these liposomes at the sciatic nerve of rats provided an initial nerve block lasting 13.5 ± 3.1 h. Repeated periods of nerve block could be induced by NIR irradiation. The effective sensitivity to light of devices has been enhanced by co-delivering dexmedetomidine [31]. As an α2-adrenergic agonist, dexmedetomidine induced local vasoconstriction maintaining a high local concentration of co-administered LA. Dexmedetomidine provided effective triggering

with irradiation at 75 mW/cm^2 over 5 min compared with 330 mW/cm^2 over 15 min without dexmedetomidine. Moreover, the threshold for providing nerve block was reduced from 76 J/cm^2 to 4 J/cm^2 with dexmedetomidine. Finally, dexmedetomidine enhanced the therapeutic effect of the released LA resulting in more nerve block events triggered (9 vs 2 without dexmedetomidine).

Unlike light, ultrasound is a common noninvasive technique that can be applied in a focused manner minimizing energy in surrounding tissue. Using parameters similar to those used in clinical imaging (high-frequency low-intensity ultrasound; HFLIU) seems to be safe [35,36]. Many of the current ultrasound-triggerable drug delivery systems, such as micelles, liposomes, composites and hybrid materials, are responsive to the thermal and mechanical effects of ultrasound waves. Recently, smart liposomes containing sonosensitizer protoporphyrin IX have been shown to release reactive oxygen species (ROS) in response to ultrasound stimuli. Once released, ROS peroxidated the unsaturated lipids in the bilayers leading to the release of LA. For example, liposomes provided ~36 h of continuous initial nerve block on a rat sciatic nerve model [37]. The nerve block duration depends on the extent and intensity of insonation. It would then allow an additional half-day off on-demand nerve block, enabling personalized narcotic-free pain management.

Based on previous studies demonstrating the efficiency of exogenous microbubbles to enhance drug flow through the skin [38], Cullion *et al.* have explored the positive effects of HFLIU in conjunction with microbubbles on two LA-mediated nerve blocks (i.e., tetrodotoxin and bupivacaine) [39,40]. Their device markedly improved LA block frequency and duration of sensory and motor nerve block. For example, 25 μM tetrodotoxin in combination with HFLIU and microbubble treatment resulted in reliable nerve block, and 30 μM tetrodotoxin induced a nerve block greater than or equal to the duration achieved with 0.5% bupivacaine.

To summarize, these innovative triggerable drug delivery systems should achieve adjustable on-demand local anesthesia in terms of dose magnitude and timing. The dynamic range of release kinetics can be adjusted by changing the composition and geometry of the membrane to match the therapeutic window for optimized analgesia. However, efforts must be continued to provide excellent reproducibility and low off-state leakage. Once optimized, these devices based on continuous-wave laser systems or LEDs would be perfectly adapted for point-of-care systems, reducing the costs of health systems. Table 3 shows the main results obtained from biological studies.

Biological drawbacks of high levels of LA

Regardless of the method or delivery system used, local release of high levels of LA could impact the short-time wound healing process. This could partially be the result of the deregulation of the initial inflammatory response and later tissue proliferation. The overall pathways of bone healing include inflammation response phase, hemostasis phase, tissue repair phase and remodeling phase. Consequently, there is a clinical need to document these effects and the potential impacts on the clinical outcome of patients.

Inflammatory response

LAs have been described to have anti-inflammatory properties during the main stages of bone healing (i.e., homeostasis, inflammation, proliferation, differentiation). Despite the fact that the molecular mechanism of their anti-inflammatory effect remains unclear, several hypotheses have been proposed. For example, perioperative immunosuppression observed in surgical patients, as well as the proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, synergistically increases its suppressive effects on the immune system [41]. Also, LAs could modulate various steps of the inflammatory cascade including leukocyte adhesion, migration, activation and granulocyte phagocytosis. Furthermore, LAs have been shown to affect polymorphonuclear neutrophils (PMNs) directly, as well as macrophage and monocyte function in a dose-dependent and reversible manner [42]. Ropivacaine and lidocaine (100–300 mM) decreased tumor necrosis factor (TNF)-α-induced upregulation of CD11b/CD18 surface expression on PMNs *in vitro*, thus leading to a decrease of PMN adherence, migration and accumulation at the site of inflammation [41].

Local tissue reactivity has also been assessed after injection of liposomes containing LA. Animals receiving liposomes showed mild inflammation at the injection site. Foamy macrophages were observed at the injection site, showing particle uptake [31]. The mild inflammation from liposome injections is generally considered safe [20,43]. Recently, safety concerns relating to the new generation of triggered drug delivery systems have been addressed. For example, insonation caused no significant inflammation when ultrasound parameters were similar to those used for therapeutic ultrasounds [37].

Tissue injury

In vitro LAs have shown cytotoxic effects on muscular cells [44], fibroblast cell lines [45] and intervertebral disc cells [46]. This could undermine neovascularization, fibroblast proliferation and collagen secretion, and could downregulate the proliferative stage of wound healing. Bupivacaine caused more myotoxic damage than levobupivacaine and ropivacaine in the skeletal muscle of rats [44].

Animals injected with liposomes loaded with LA showed mild inflammation at the injection site, whereas minimal inflammation was seen in the adjacent muscle [31] and no significant tissue toxicity was reported from liposomes [20]. Moreover, special attention should be paid to the latest generation of triggered drug delivery systems. For example, animals treated with 1 MHz ultrasound for 5 min at an acoustic intensity of 0.1 W/cm^2 had mild residual inflammation at 14 days and myotoxicity had resolved by 14 days [40]. Similarly, there was no tissue toxicity either immediately after applying ultrasound at 3 W/cm^2, 1 MHz, 10 min or in the following four days [37]. Because ultrasound can have intrinsic effects on neuronal function, neurotoxicity of these triggered systems has also been evaluated. Previous studies using animal models of neuronal injury demonstrated that neuronal suppression secondary to acoustic waves is proportional to acoustic intensity administered, with focused high intensity (35 W/cm^2) resulting in suppressed axonal conduction. Intensities of 390–3000 W/cm^2 generating nerve block that lasts for weeks, and very high intensity (7890 W/cm^2) causes almost complete axon degeneration [47]. Fortunately, these intensities are orders of magnitude higher than those required by these triggered delivery systems. At lower ultrasound intensities, ultrasound induces nerve stimulation rather than suppression. Applying HFLUI did not induce nerve damage during a 2-week observation period following injec-

TABLE 3

Summary of data obtained from *in vitro* and *in vivo* evaluations of LA delivery systems

***In vitro* studies**

Authors	*Year*	*Materials*	*Formulation*	*Loaded LA*	*Duration of release*	*Refs*
Ma *et al.*	2017	PLGA hybrid	Nanoparticles	Bupivacaine	96 h	[15]
Wang *et al.*	2016	Lipid–polymer hybrid	Nanoparticles	Lidocaine	72 h	[16]
Wang *et al.*	2016	PELA	Nanoparticles	Ropivacaine	3 days	[16]
Verron *et al.*	2010	CaP	Microgranules	Bupivacaine	24 h	[27]
Irbe *et al.*	2012	CaP	Cement	Lidocaine	6 days	[28]
Colpo *et al.*	2018	CaP	Cement	Bupivacaine Levobupivacaine	60% at 144 h	[29]
Dupleichs *et al.*	2018	CaP	Cement	Bupivacaine Ropivacaine	72% at 96 h 64% at 96 h	[30]
Rwei *et al.*	2017	Sonosensitizer	Liposome	Tetrodotoxin	7% at 2 h	[31]
Zhan *et al.*	2016	Gold nanorod	Liposome	Tetrodotoxin	10% at 10 min	[32]
Zhan *et al.*	2017	Gold nanorod	Liposome	Tetrodotoxin	2–19% irradiation	[33]
Rwei *et al.*	2015	Photosensitizer	Liposome	Tetrodotoxin	5.6% at 2 h	[34]

***In vivo* studies**

Authors	*Year*	*Materials*	*Formulation*	*Loaded LA*	*Duration of anesthetic effect*	*Refs*
Schmidt *et al.*	2015	PLGA	Microsphere	Bupivacaine	144 h	[13]
Qi *et al.*	2016	PELA	Nanoparticles	Ropivacaine	3 days	[14]
McAlvin *et al.*	2014	PLGA	Liposome	Bupivacaine	240 min	[17]
Rwei *et al.*	2018	Lipid mixture	Liposome	Bupivacaine	16 h	[23]
Verron *et al.*	2010	CaP	Microgranules	Bupivacaine	72 h	[27]
Dupleichs *et al.*	2018	CaP	Cement	Bupivacaine Ropivacaine	>72 h >72 h	[30]
Rwei *et al.*	2017	Sonosensitizer	Liposome	Tetrodotoxin	36 h	[31]
Zhan *et al.*	2016	Gold nanorod	Liposome	Tetrodotoxin	5 h	[32]
Zhan *et al.*	2017	Gold nanorod	Liposome	Tetrodotoxin	62 h	[33]
Rwei *et al.*	2015	Photosensitizer	Liposome	Tetrodotoxin	24 h	[34]
Cullion *et al.*	2018	Lipid mixture sonication	Microbubbles	Tetrodotoxin	134 min	[40]

Abbreviation: LA, local anesthetic.

tion [40]. Similarly, no significant neurotoxicity was observed in any animals receiving ultrasounds at high frequency (1 MHz, 3 W/cm^2) [37].

Hemostasis

Although it is well-known that LA infiltration causes vasoconstriction at low concentrations and vasodilation at high concentrations, the vasoactive effect varies depending on the drug used, because the latter determines either vasoconstriction or vasodilation. For example, prilocaine and mepivacaine are rather vasoconstrictory at clinical doses whereas lidocaine has vasodilator activity. Of the two enantiomers of bupivacaine, the S(−)levorotatory one seems the most vasoconstrictive. However, changes in the pulpal blood flow measured in patients treated with 0.5% levobupivacaine or 0.5% bupivacaine are not statistically different [48].

Also, vasoconstrictor molecules have usually been added to LA to effectively reduce drug absorption and toxicity, as well as surgical bleeding. Although a recent RCT found that, after total hip arthroplasty, LA with epinephrine infiltration did not significantly modify pre- and post-operative bleeding [49], LA infiltration has been shown to reduce bleeding after TKA. Hemostasis changes have been extensively studied following injections of various LAs ± epinephrine in patients undergoing dentistry surgery such as tooth extractions [50–52]. Data strongly suggest an absence of significant hemodynamic modifications regardless of the administration protocol used (concentration of LA, ratio of LA:epinephrin). Nevertheless, further studies are still needed to address the related mechanisms affected by LAs to understand the mechanism of vasodilative and vasoconstrictive effects.

Osteoarticular regeneration

Effects of LAs on mesenchymal stem cell (MSC) activity have been studied because they can differentiate into a variety of cell types, including osteoblasts, chondrocytes, myocytes and adipocytes. MSCs probably play a crucial part in healing following surgical procedures such as microfracture and ligament reconstruction. Ropivacaine caused the fewest adverse effects on human MSCs, whereas lidocaine or bupivacaine seem to induce the most significant effects on MSC viability [53]. Herencia *et al*. investigated the role of procaine in osteo/odontogenesis of rat bone marrow MSCs *in vivo* [54]. They observed that procaine administration drastically

reduces the mineralization and osteo/odontogenesis of bone marrow MSCs by inhibiting the Wnt/β-catenin pathway through the increase of Gsk3β expression and β-catenin phosphorylation. These effects of procaine were also observed on mature osteoblasts.

Chondrolysis is the irreversible destruction of previously normal articular cartilage, including the matrix and cellular element. Intra-articular injection of LAs increased risk of chondrolysis for patients after articular surgeries [55]. However, potential associations, including high-flow intra-articular pain pumps, thermal devices, type of anchors and various sutures must be taken in consideration. A causal relationship between the infusion of LAs and the development of glenohumeral chondrolysis has been established [56]. Results showed bupivacaine, lidocaine, ropivacaine and levobupivacaine are all toxic to cartilage in a dose-dependent manner. In summary, although these devices are biocompatible, potential biological drawbacks as a result of high local levels of LAs highlight the need to control and optimize the release of LAs from the delivery systems.

Concluding remarks and future perspectives

Multimodal management of postoperative pain is based on the administration of LAs. One of the major challenges is to design a biocompatible and resorbable biomaterial capable of delivering LAs continuously at therapeutic doses *in situ* without damaging the surrounding soft tissues (Table 2). Even though the clinical efficacy of such smart delivery systems might be of high benefit in pain management, an objective comparison of results from different studies remains difficult owing to the various protocols and formulations used. Furthermore, interpretation of *in vivo* data is extremely complex because it depends on the animal model, the nerve blocks tested and the pain assessment methods. Indeed, pain assessment is obviously operator- and animal-model-dependent. Standard and validated international guidelines in the spirit of International Conference Harmonization guidelines for drug approvals would be extremely helpful for comparing all these delivery systems. The absence of standardized methods could explain why only a few formulations are the subject of ongoing clinical trials or on the market.

Inflammation, neurotoxicity and myotoxicity are of the greatest concern and seem to be related to high local concentrations of LAs. Although several studies in the literature reported the absence of adverse cellular and tissue responses, it seems premature to conclude on the safety of high local levels of LA. In addition, recent methods of stimulation based on light or ultrasound could interfere and undermine the bone healing process. Finally, local production of ROS must be tightly regulated because ROS will dramatically affect bone cell health and thus bone regeneration. All these concerns need to be extensively investigated in further studies to recommend the clinical use of these delivery systems for the entire population.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding this review.

References

1 Wylde, V. *et al.* (2015) Preoperative widespread pain sensitization and chronic pain after hip and knee replacement: a cohort analysis. *Pain* 156, 47–54
2 Fletcher, D. *et al.* (2017) An exploratory study of the long-term impact of difficulty kneeling after total knee replacement. *Disabil. Rehabil.* 3, 1–6
3 Wylde, V. *et al.* (2017) Systematic review of management of chronic pain after surgery. *Br. J. Surg.* 104, 1293–1306
4 Wylde, V. *et al.* (2018) Clinical- and cost-effectiveness of the STAR care pathway compared to usual care for patients with chronic pain after total knee replacement: study protocol for a UK randomised controlled trial. *Trials* 19, 132
5 Sunderland, S. *et al.* (2016) Regional versus general anesthesia and the incidence of unplanned health care resource utilization for postoperative pain after wrist fracture surgery: results from a retrospective quality improvement project. *Reg. Anesth. Pain Med.* 41, 22–27
6 Barrington, J.W. (2015) Efficacy of periarticular injection with a long-acting local analgesic in joint arthroplasty. *Am. J. Orthop.* 44 (suppl. 10), 13–16
7 King, C.H. *et al.* (2017) Pharmacologic properties of novel local anesthetic agents in anesthesia practice. *Anesthesiol. Clin.* 35, 315–325
8 Golembiewski, J. and Dasta, J. (2015) Evolving role of local anesthetics in managing postsurgical analgesia. *Clin. Ther.* 37, 1354–1371
9 Lirk, P. *et al.* (2014) Local anaesthetics: 10 essentials. *Eur. J. Anaesthesiol.* 31, 575–585
10 Stueber, T. *et al.* (2016) Quaternary lidocaine derivative QX-314 activates and permeates human TRPV1 and TRPA1 to produce inhibition of sodium channels and cytotoxicity. *Anesthesiology* 124, 1153–1165
11 Kuang, M.-J. *et al.* (2017) Is adductor canal block better than femoral nerve block in primary total knee arthroplasty? A GRADE analysis of the evidence through a systematic review and meta-analysis. *J. Arthroplasty* 32, 3238–3248
12 Kuchálik, J. *et al.* (2017) Local infiltration analgesia or femoral nerve block for postoperative pain management in patients undergoing total hip arthroplasty. A randomized, double-blind study. *Scand. J. Pain* 16, 223–230
13 Schmidt, B. *et al.* (2015) Local pathology and systemic serum bupivacaine after subcutaneous delivery of slow-releasing bupivacaine microspheres. *Anesth. Analg.* 120, 36–44
14 Wang, Z. *et al.* (2016) Long-term effect of ropivacaine nanoparticles for sciatic nerve block on postoperative pain in rats. *Int. J. Nanomed.* 11, 2081–2090
15 Ma, P. *et al.* (2017) Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 89, 689–695
16 Wang, J. *et al.* (2016) An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: lidocaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy. *Drug Deliv.* 23, 1254–1260
17 McAlvin, J.B. *et al.* (2014) Multivesicular liposomal bupivacaine at the sciatic nerve. *Biomaterials* 35, 4557–4564
18 Portillo, J. *et al.* (2014) Safety of liposome extended-release bupivacaine for postoperative pain control. *Front. Pharmacol.* 5, 90
19 Rice, D.C. *et al.* (2015) Posterior intercostal nerve block with liposomal bupivacaine: an alternative to thoracic epidural analgesia. *Ann. Thorac. Surg.* 99, 1953–1960
20 Ilfeld, B.M. *et al.* (2015) Safety and side effect profile of liposome bupivacaine (Exparel) in peripheral nerve blocks. *Reg. Anesth. Pain Med.* 40, 572–582
21 Liu, S.-Q. *et al.* (2017) Comparison of periarticular anesthesia with liposomal bupivacaine with femoral nerve block for pain control after total knee arthroplasty: a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine* 96, e6462
22 Kirkness, C.S. *et al.* (2016) Assessment of liposome bupivacaine infiltration versus continuous femoral nerve block for postsurgical analgesia following total knee arthroplasty: a retrospective cohort study. *Curr. Med. Res. Opin.* 18, 1–10
23 Rwei, A.Y. *et al.* (2018) Prolonged duration local anesthesia using liposomal bupivacaine combined with liposomal dexamethasone and dexmedetomidine. *Anesth. Analg.* 126, 1170–1175
24 Bouler, J.M. *et al.* (2017) Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: a review of biological response. *Acta Biomater.* 53, 1–12
25 Verron, E. *et al.* (2012) Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs. *Acta Biomater.* 8, 3541–3551
26 Verron, E. *et al.* (2010) Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discov. Today* 15, 547–552
27 Verron, E. *et al.* (2010) Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 94, 89–96
28 Irbe, Z. *et al.* (2012) Controlled release of local anesthetic from calcium phosphate bone cements. *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.* 32, 1690–1694

29 Colpo, J. *et al.* (2018) Antibiotic and anesthetic drug release from doubler-setting TCP cements. *J. Mater. Sci. Biomater.* 53, 7112–7124
30 Dupleichs, M. *et al.* (2018) Pain management after bone reconstruction surgery using an analgesic bone cement: a functional non-invasive *in vivo* study using gait analysis. *J. Pain* doi: https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.04.014
31 Rwei, A.Y. *et al.* (2017) Multiply repeatable and adjustable on-demand phototriggered local anesthesia. *J. Control. Release* 251, 68–74
32 Zhan, C. *et al.* (2016) Phototriggered local anesthesia. *Nano Lett.* 16, 177–181
33 Zhan, C. *et al.* (2017) Ultrasensitive phototriggered local anesthesia. *Nano Lett.* 17, 660–665
34 Rwei, A.Y. *et al.* (2015) Repeatable and adjustable on-demand sciatic nerve block with phototriggerable liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15719–15724
35 Schoellhammer, C.M. *et al.* (2017) Defining optimal permeant characteristics for ultrasound-mediated gastrointestinal delivery. *J. Control. Release* 268, 113–119
36 Fan, C.-H. *et al.* (2015) Drug-loaded bubbles with matched focused ultrasound excitation for concurrent blood–brain barrier opening and brain-tumor drug delivery. *Acta Biomater.* 15, 89–101
37 Rwei, A.Y. *et al.* (2017) Ultrasound-triggered local anaesthesia. *Nat. Biomed. Eng.* 1, 644–653
38 Rangsimawong, W. *et al.* (2017) Influence of sonophoresis on transdermal drug delivery of hydrophilic compound-loaded lipid nanocarriers. *Pharm. Dev. Technol.* 22, 597–605
39 Cullion, K. *et al.* (2018) Ultrasound-triggered liposomes for on-demand local anesthesia. *Ther. Deliv.* 9, 5–8
40 Cullion, K. *et al.* (2018) High-frequency, low-intensity ultrasound and microbubbles enhance nerve blockade. *J. Control. Release* 276, 150–156
41 Cruz, F.F. *et al.* (2017) Anti-inflammatory properties of anesthetic agents. *Crit. Care* 21, 67
42 Picardi, S. *et al.* (2013) Local anesthetic-induced inhibition of human neutrophil priming: the influence of structure, lipophilicity, and charge. *Reg. Anesth. Pain Med.* 38, 9–15
43 Burbridge, M. and Jaffe, R.A. (2015) Exparel®: a new local anesthetic with special safety concerns. *Anesth. Analg.* 121, 1113–1114
44 Öz Gergin, Ö. *et al.* (2015) Comparison of the myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine, and ropivacaine: an electron microscopic study. *Ultrastruct. Pathol.* 39, 169–176
45 Sung, C.-M. *et al.* (2014) Cytotoxic effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rotator cuff tenofibroblasts. *Am. J. Sports Med.* 42, 2888–2896
46 Cai, X.-Y. *et al.* (2014) Comparison of toxicity effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rabbit intervertebral disc cells *in vitro*. *Spine J.* 14, 483–490
47 Lee, Y.-F. *et al.* (2015) Nerve conduction block in diabetic rats using high-intensity focused ultrasound for analgesic applications. *Br. J. Anaesth.* 114, 840–846
48 Brajkovic, D. *et al.* (2014) Levobupivacaine vs bupivacaine for third molar surgery: quality of anaesthesia, postoperative analgesia and local vascular effects. *Clin. Oral. Investig.* 18, 1481–1488
49 Villatte, G. *et al.* (2016) Effect of local anaesthetic wound infiltration on acute pain and bleeding after primary total hip arthroplasty: the EDIPO randomised controlled study. *Int. Orthop.* 40, 2255–2260
50 Abu-Mostafa, N. *et al.* (2015) Hemodynamic changes following injection of local anesthetics with different concentrations of epinephrine during simple tooth extraction: a prospective randomized clinical trial. *J. Clin. Exp. Dent.* 7, e471–e476
51 Kaur, P. *et al.* (2016) Comparing hemodynamic and glycemic response to local anesthesia with epinephrine and without epinephrine in patients undergoing tooth extractions. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* 7, 166–172
52 Hashemi, S.H.J. *et al.* (2016) Comparative assessment of the effects of three local anesthetics: lidocaine, prilocaine, and mepivacaine on blood pressure changes in patients with controlled hypertension. *Glob. J Health Sci.* 8, 54157
53 Wu, T. *et al.* (2018) Cytotoxicity of local anesthetics in mesenchymal stem cells. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 97, 50–55
54 Herencia, C. *et al.* (2016) Procaine inhibits osteo/odontogenesis through Wnt/β-catenin inactivation. *PLoS One* 11, e0156788
55 Breu, A. *et al.* (2015) Local anesthetic cytotoxicity on human mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 23, 937–945
56 Gulihar, A. *et al.* (2015) Articular cartilage and local anaesthetic: a systematic review of the current literature. *J. Orthop.* 12 (suppl. 2), 200–210

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Développement de ciments phosphocalciques combinés à des agents d'intérêt thérapeutique

Mots clés : ciment phosphocalcique, libération locale, douleur osseuse, anesthésique local, gallium, catwalk

Résumé : La douleur postopératoire consécutive à la reconstruction osseuse est une complication fréquente susceptible de compromettre le succès global d'une intervention chirurgicale. Cette douleur, sujette à chronicisation, doit être gérée dès les premiers jours postopératoires. Cette thèse s'inscrit dans le développement de ciments phosphocalciques (CPCs) combinés injectables pouvant délivrer in situ des anesthésiques locaux (AL). Ces ciments, une fois formulés et caractérisés, ont montré une libération in vitro des AL pendant 2 semaines. Une évaluation fonctionnelle de la démarche a été réalisée grâce au système CatWalk à partir d'un modèle in vivo de douleur postopératoire après une intervention de reconstruction osseuse. Les résultats ont montré un soulagement significatif de la douleur pendant la période postopératoire à court terme. Le CPC chargé en bupivacaïne a présenté une récupération fonctionnelle plus rapide que le CPC chargé en ropivacaïne. Ces CPCs constitueraient une nouvelle approche de la prise en charge de la douleur postopératoire.
Dans cette stratégie locale, le potentiel thérapeutique du gallium sur les maladies osseuses nous a conduits à introduire du maltolate de gallium, GaM (antitumoral, antidouleur) dans des CPCs. L'association de la caséine et du GaM a permis la formulation de nouveaux ciments composites dont la libération du principe actif a pu être modulée.

Ces nouveaux systèmes combinés possèdent les propriétés requises comme ciments de comblement osseux et ouvrent de grandes perspectives pré-cliniques et cliniques. Ils permettraient de répondre à des contextes délicats pour lesquels les solutions thérapeutiques actuelles sont insatisfaisantes.

Title: Development of calcium phosphate cement combined with agents of therapeutic interest

Keywords: calcium phosphate cement, drug-device combination, bone pain, local anesthetic drug, gallium, catWalk gait analysis

Abstract: Postoperative pain following bone reconstruction is a serious complication that could jeopardize the global success of a surgery. This pain, which is highly prone to chronicization, must be controlled and minimized during the first postoperative days. This thesis consists in the development of injectable loaded calcium phosphate cements (CPCs) able to deliver in situ local anesthetics (LA). These cements, once formulated and characterized, showed an in vitro release of LA during 2 weeks. A functional evaluation of the gait was performed using the CatWalk system in an in vivo model of postoperative pain following bone reconstructive surgery. The results demonstrated significant pain relief during the short-term postoperative period. Bupivacaine-loaded CPC provided an earlier return to functional recovery than ropivacaine-loaded CPC. These CPCs would constitute a new approach to the management of postoperative pain after orthopedic bone surgery.
In this local strategy, the therapeutic potential of gallium on bone disorder led us to insert gallium maltolate, GaM (antitumor, painkiller) inside CPCs. The association of casein and GaM allowed the formulation of new composite cements whose active molecule release has been then modulated.

These new combined systems have the required properties for bone void filler and open great pre-clinical and clinical perspectives to treat complex orthopedic situations which currently don't benefit from satisfactory therapeutic solutions.