

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE : Sciences et Ingénierie en Matériaux, Mécanique, Energétique et
Aéronautique

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface

Thèse N° 2/2012

Mémoire de thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Matériaux Céramiques et Traitements de Surface

Présentatée et soutenue par

Hiva BARADARI

Le 27 Janvier 2012

Elaboration et fonctionnalisation thérapeutique de sphéroïdes phosphocalciques

Thèse dirigée par **Marylène VIANA**

Co-dirigée par **Chantal DAMIA**

JURY :

Rapporteurs :

Mr Jean-Christophe Hornez _____ Université de Valenciennes

Pr Philippe Legrand _____ Université de Montpellier I

Examineurs :

Pr Dominique Chulia _____ Université de Limoges

Pr Christèle Combes _____ INP de Toulouse

Mme. Chantal Damia _____ Université de Limoges

Mme. Marylène Viana _____ Université de Limoges

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé de Septembre 2009 à Janvier 2012 au sein de l'équipe « Procédés céramiques – Axe 1 », plus précisément dans l'équipe « Biocéramiques » du laboratoire Science des Procédés Céramiques et Traitements de Surface (SPCTS) à Limoges.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Thierry Chartier, directeur de recherche CNRS et directeur de l'équipe UMR 7315, de m'avoir accueillie au sein du SPCTS.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude à Madame Marylène Viana ainsi qu'à Madame Chantal Damia, pour avoir encadré cette thèse. Qu'elles soient sincèrement remerciées pour leur disponibilité, leur compréhension et leur grande clairvoyance scientifique qui m'ont permis d'évoluer durant ces trois années et rien ne pourra traduire en mots ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Christophe Hornez et Monsieur Philippe Legrand de m'avoir fait l'honneur d'accepter être rapporteur de ce travail. Qu'ils soient assurés de mon profond respect.

Je voudrais remercier très chaleureusement Madame Dominique Chulia, Professeur à l'Université de Limoges, qui m'a fait l'honneur d'être présidente de mon jury de thèse ; ainsi que Madame Christèle Combes, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse, pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci à Monsieur Eric Champion du SPCTS pour ses discussions enrichissantes sur le thème des biomatériaux.

Je tiens à remercier Madame Sophie Cazalbou du CNRS CIRIMAT de Toulouse pour son aide précieuse concernant les mesures de porosité.

Je remercie également Monsieur Etienne Laborde, ingénieur d'études au laboratoire SPCTS, sans qui la synthèse de l'hydroxyapatite n'aurait probablement pas pu être réalisée dans un délai raisonnable.

Je ne saurais oublier Solange Degot, Pierre Carles et Richard Mayet pour leurs conseils avisés.

Je voudrais également remercier ceux sans qui l'histoire « phosphate de calcium » n'aurait pas été la même, il s'agit bien entendu de Nathalie Douard, Sabrina Martinet, Marie Lasgorceix, Nathalie Pécout et Karine Giry. Merci à vous pour votre patience, votre disponibilité et vos conseils qui m'ont permis d'avancer.

Je ne peux clore ce chapitre sans remercier ma famille qui m'a soutenu moralement et financièrement tout au long de mes études en France, même si il y a 4000 kilomètres entre nous. Soyez certains, Papa, Maman, que je vous en serai éternellement reconnaissante. Je tiens aussi à remercier Solène, Lise, Stèphe, Gosia, Déborah, Séb, Raphe F., Raphe M, Antoine, Claire, Flo, Christine, Xavier et Quantin, toujours présents quand j'en avais besoin.

Chapitre I- Synthèse bibliographique	17
I-1- L'os et le tissu osseux.....	19
I-1-1- Constitution de l'os.....	19
I-1-2- Le remodelage osseux.....	21
I-2- Les substituts osseux.....	22
I-2-1- Les greffes osseuses.....	22
I-2-2- Les phosphates de calcium.....	23
1-2-2-1- Présentation générale.....	23
1-2-2-2- L'hydroxyapatite phosphocalcique et le phosphate tricalcique bêta.....	25
1-2-2-3- Applications en comblement osseux.....	28
I-3- Méthodes d'élaboration des substituts phosphocalciques poreux.....	29
I-3-1- Les procédés par moulage.....	30
I-3-2- Les procédés par voie solide.....	31
I-4- Le traitement localisé des pathologies osseuses par des substituts fonctionnalisés.....	34
1-4-1- Infections osseuses.....	35
1-4-2- Cancers du tissu osseux.....	38
1-4-3- Pathologies musculo-squelettiques.....	39
I-5- Développement d'un « Drug Delivery System » : système combiné biocéramique phosphocalcique poreuse/principe actif.....	41
Article: <i>Calcium phosphate scaffolds as drug delivery systems: drug loading and release influencing parameters</i>	
Abstract.....	42
I- Introduction.....	42
II- Drug carrier physical parameters.....	45
III- Drug/carrier interactions.....	49
IV- Drug loading conditions.....	54
V- <i>In vitro</i> drug delivery evaluation conditions.....	56
Concluding remarks.....	61
I-6- Positionnement de l'étude.....	62

Chapitre II- Développement du système combiné : Sphéroïdes phosphocalciques poreux/ibuprofène.....	79
II-1- Démarche expérimentale.....	83
II.1.1. Elaboration et caractérisation des sphéroïdes phosphocalciques poreux.....	83
II.1.2. Fonctionnalisation thérapeutique des sphéroïdes phosphocalciques.....	85
II.1.3. Caractérisation des sphéroïdes chargés.....	88
II-2- Etude du système sphéroïdes phosphate tricalcique beta/ibuprofène.....	93
Article: <i>β-TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system Ibuprofen/carrier physicochemical interactions</i>	95
Abstract.....	95
1. Introduction.....	95
2. Materials and methods.....	97
2.1. Preparation of porous β-TCP pellets.....	97
2.2. Drug loading.....	97
2.3. Physicochemical characterisations.....	98
2.4. In vitro ibuprofen release.....	99
3. Results.....	99
3.1. β-TCP pellets characteristics.....	99
3.2. Drug adsorption behaviour.....	102
3.3. Loaded β-TCP pellet characterisation.....	104
3.4. β-TCP pellet characterisation after ibuprofen desorption.....	106
3.5. In vitro ibuprofen release.....	106
4. Discussion.....	107
5. Conclusions.....	109
II-3- Influence de la composition chimique des sphéroïdes phosphocalciques poreux sur l'adsorption et la libération de l'ibuprofène.....	115
Article <i>Porous calcium phosphate pellets as drug delivery systems: Effect of drug carrier composition on drug loading and in vitro release</i>	117
Abstract.....	117

1. Introduction.....	117
2. Materials and methods	119
2.1. Porous pellets fabrication.....	119
2.2. Drug loading.....	119
2.3. In vitro ibuprofen dissolution kinetics	120
2.4. Physico-chemical characterisations.....	121
3. Results.....	122
3.1. CaP pellets characteristics.....	122
3.2. Drug adsorption behaviour.....	124
3.3. Ibuprofen loaded CaP pellets characteristics	126
3.4. In vitro ibuprofen dissolution kinetics	129
4. Discussion	131
Conclusion.....	135
II-4- Influence des paramètres texturaux des sphéroïdes phosphocalciques poreux sur l'adsorption et la libération de l'ibuprofène	141
Article: <i>Effect of physical parameters of porous calcium phosphate pellets on ibuprofen loading and delivery properties</i>	143
Abstract	143
1. Introduction.....	143
2. Materials and methods	145
2.1. Porous pellets preparations	145
2.2. Drug loading.....	145
2.3. In vitro drug dissolution kinetics	146
2.4. Physicochemical characterisations	146
3. Results.....	147
3.1. Porous pellets characteristics	147
3.2. Ibuprofen loaded pellets characteristics.....	151
3.3. Effect of heat treatment temperature on the delivery system	153
3.3.1. Drug loading.....	153
3.3.2. In vitro drug dissolution	155
3.4. Effect of pellets size on the delivery system	156
3.4.1. Drug loading.....	156
3.4.2. In vitro drug dissolution	157
4. Discussion	158
Conclusion.....	161
II-5- Conclusion	167

Chapitre III- Etude de l'imprégnation *ex situ* des sphéroïdes phosphocalciques.....171

III-1- Introduction	173
III-2- Etude de l'imprégnation des sphéroïdes phosphocalciques par des solutions organiques de l'ibuprofène.....	177
Article: <i>β-tricalcium phosphate porous pellets for local ibuprofen delivery: effect of impregnation parameters on drug content adjustment and drug release</i>	179
Abstract	179
1. Introduction.....	179
2. Materials and methods	180
2.1. Porous pellets fabrication and characterisations	180
2.2. Drug loading procedure.....	182
2.3. In vitro drug release kinetics study.....	184
3. Results.....	185
3.1. Evaluation of impregnation parameters on the pellets drug content	185
3.2. Influence of impregnation solvent on in vitro ibuprofen release.....	188
4. Discussion	190
Conclusion.....	194
III-3- Conclusion	199

Chapitre IV- Quantification et localisation de l'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes phosphocalciques	203
IV-1- Introduction	205
IV-2- Quantification et localisation de l'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes phosphocalciques	209
<i>Analytical approach to drug delivery systems evaluation: case of ibuprofen adsorption on porous calcium phosphate pellets</i>	211
Abstract	211
1. Introduction	211
2. Materials and methods	212
2.1. Elaboration of porous pellets loaded by ibuprofen.....	212
2.2. Ibuprofen loaded pellets characterisation methods	213
3. Results and discussion	215
3.1. Determination of the drug content by UV-vis spectrophotometry	215
3.2. Determination of the drug content by thermogravimetric analysis	217
3.3. Raman spectroscopy analysis	219
3.4. Comparison of the three methods.....	222
Conclusion	223
Annexe 1	237
Annexe 2	241

Introduction

Les pathologies osseuses et articulaires d'origine infectieuse, tumorale ou inflammatoire, affectent des millions de personnes dans le monde. La prise en charge de ces maladies nécessite souvent, en complément du traitement thérapeutique, une intervention chirurgicale et l'utilisation de dispositifs médicaux permanents ou temporaires. En outre, les pertes de substance osseuse d'une taille importante, conduisent le chirurgien à avoir recours à des substituts osseux pour combler la cavité.

Au cours des 60 dernières années, trois générations de biomatériaux à usage orthopédique se sont succédé : les matériaux bioinertes (première génération), les matériaux bioactifs (deuxième génération), et les matériaux conçus pour stimuler les réponses cellulaires et/ou ayant une fonction thérapeutique (troisième génération). Lorsque les matériaux synthétiques ont commencé à être utilisés, l'exigence principale était de réaliser une combinaison appropriée de leurs propriétés physiques et mécaniques avec celles du tissu à remplacer, tout en minimisant leur toxicité ainsi que la réponse immunitaire du receveur. La deuxième génération de biomatériaux, apparue au début des années 80 a été marquée par le développement de matériaux bioactifs. Ces matériaux s'intègrent intimement à l'environnement biologique améliorant ainsi la réponse tissulaire : existence d'une bonne cohésion à l'interface tissus/surface et dégradation progressive, si nécessaire, de l'implant en parallèle de la néoformation d'un tissu nouveau. La troisième génération de biomatériaux associe au substitut osseux une composante organique afin de conférer au système une fonction thérapeutique supplémentaire à celle de support à la repousse osseuse (*Drug Delivery System*) ou pour stimuler l'activité cellulaire et moléculaire dans l'environnement de l'implant (Ingenierie Tissulaire).

Les matériaux phosphocalciques ont commencé à être utilisés dans des applications de comblement osseux à partir des années 1970. En raison de leur composition chimique analogue à celle de la phase minérale de l'os, ils sont biocompatibles, c'est-à-dire bien tolérés par les tissus environnants, bioactifs et biorésorbables. De plus, ces matériaux ont la capacité de permettre la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir des berges du tissu hôte. Cette propriété d'ostéoconduction est favorisée par la présence d'un réseau de pores permettant l'invasion du support par les fluides biologiques, la pénétration des cellules osseuses, la vascularisation, l'oxygénation et la colonisation osseuse. Ces biocéramiques phosphocalciques poreuses sont également d'excellents candidats pour le développement de systèmes combinés intégrant des agents thérapeutiques pour le traitement de pathologies osseuses. Cette association vise à l'administration localisée d'un principe actif, afin de réduire les effets secondaires liés à une administration à haute dose par les voies classiques et d'augmenter l'efficacité thérapeutique par un relargage localisé et continu dans le temps. Pour répondre aux besoins cliniques, le développement des DDS nécessite une connaissance approfondie des mécanismes qui gouvernent les propriétés finales du système. Il est également nécessaire de développer les outils pour une caractérisation la plus complète possible, de manière à proposer un système de délivrance contrôlée, adaptée et efficace.

Le travail présenté ici, a pour objectif d'étudier un DDS composé de sphéroïdes phosphocalciques poreux en combinaison avec de l'ibuprofène. La forme sphérique des supports, ainsi que leur porosité inter et intra granulaire, leur confèrent des propriétés adéquates pour le comblement de cavités osseuses de forme complexe. L'agent anti-inflammatoire associé permet de proposer ce DDS pour

améliorer le traitement de pathologies inflammatoires, par la libération *in situ* de l'ibuprofène. Les sphéroïdes poreux ont été fabriqués par granulation humide à haut cisaillement, en utilisant deux phosphates de calcium au comportement biologique différent, l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique beta. Dans un premier temps, en raison de leur incidence directe sur les quantités chargées et sur les cinétiques de libération de la molécule active, les mécanismes d'interaction entre l'ibuprofène et les sphéroïdes ont été étudiés. Ensuite, l'influence de la texture des supports et des conditions de chargement sur l'adsorption de l'ibuprofène a été évaluée. Enfin, une caractérisation approfondie des supports chargés a été mise en œuvre.

Ce travail de thèse, effectué au sein du laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface (SPCTS UMR CNRS 7315), soutenu financièrement sous la forme d'une bourse d'étude par la Région Limousin, s'inscrit dans la thématique « Biocéramiques, applications thérapeutiques et ingénierie tissulaire ».

La majeure partie de ce travail est présentée sous forme de publications précédées d'une synthèse de leur contenu, rédigée en français.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

La synthèse bibliographique de ce travail est organisée en trois parties principales. Après avoir présenté le tissu osseux, les substituts synthétiques ainsi que leurs modes d'élaboration seront brièvement décrits. Un paragraphe sera ensuite consacré aux pathologies osseuses. Puis, les applications des substituts précédemment décrits en tant que « Drug Delivery System », pour une libération localisée et contrôlée de molécules actives, seront ensuite exposées. Une attention particulière sera apportée à la mise en lumière des paramètres susceptibles d'affecter leurs caractéristiques thérapeutiques (quantité de molécule active adsorbée et cinétiques de libération).

I-1- L'os et le tissu osseux

Les rôles de protection, de locomotion et de mastication sont essentiellement assurés par les tissus durs du corps humain, c'est-à-dire les os et les dents. La forme, la taille et la structure d'un os sont conditionnées par la fonction qu'il occupe au sein du corps humain. Les os des côtes protègent le cœur et les poumons, ceux de la voûte crânienne le cerveau et d'autres assurent la locomotion en constituant des points d'attache pour les muscles et les tendons. A l'échelle cellulaire, l'os est un site de protection et de production pour les moelles osseuses rouge et jaune, respectivement impliquées dans la formation des cellules sanguines et le stockage des tissus adipeux. Enfin, le tissu osseux est un réservoir en sels minéraux. Il contient 99% du calcium et 85% du phosphore total de l'organisme et est utilisé par le système endocrinien pour réguler les taux de calcium et de phosphore dans la circulation des fluides biologiques [Athanasidou'00-Barrère'08-Shea'05].

I-1-1- Constitution de l'os

L'os est constitué de deux parties distinctes : la partie périphérique et la partie centrale. La partie centrale ou os spongieux, est constituée d'un tissu riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins (figure I-1). En fonction des facteurs génétiques, métaboliques et de la fonction même de l'os, la porosité de l'os spongieux est comprise entre 75 et 95 % et sa densité est de l'ordre de $0,2 \text{ g.cm}^{-3}$. La partie périphérique ou os compact, est plus dure et plus dense. Sa porosité varie entre 5 et 30 % et sa densité est d'environ $1,8 \text{ g.cm}^{-3}$ [Shea'05]. D'un point de vue organisation, l'os est constitué d'une matrice extracellulaire composée d'une phase organique et d'une phase minérale, et de cellules, principalement les ostéoblastes et les ostéoclastes.

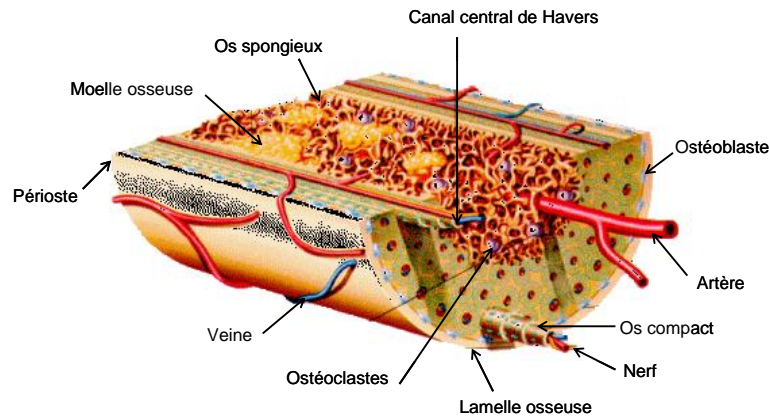
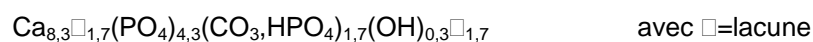


Figure I-1- Schéma en coupe d'un os long

La partie organique, ou substance intercellulaire, est essentiellement composée de collagène de type I. Représentant environ 90 % du poids de la matrice organique de l'os sec, le collagène est une glycoprotéine fibreuse, rigide, en forme de tresse à trois brins, il confère à l'os sa flexibilité. La phase organique de l'os contient également diverses protéines non collagéniques telles que des glycoprotéines (ostéonectine, ostéopontine, sialoprotéine, fibronectine), des protéines contenant des résidus d'acide glutamique carboxylé (ostéocalcine), des phosphoprotéines, des phospholipides, des protéoglycanes ou encore des facteurs de croissance [Gelse'03].

La composition chimique de la partie minérale de la matrice osseuse est complexe et dépend de la nature de l'os (compact, spongieux) ainsi que de l'âge, de l'alimentation et du sexe de l'individu. Cependant, il est admis que c'est une apatite carbonatée mal cristallisée proche d'une hydroxyapatite partiellement substituée par des ions comme CO_3^{2-} , HPO_4^- ou encore Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , F^- et contenant de nombreux éléments traces (Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ...). En ne prenant en considération que les éléments majoritaires, le minéral osseux peut être représenté par une apatite déficiente en calcium et substituée, de formule générale [Legros'84] :



Les cristaux d'hydroxyapatite ont une forme de plaquette de 20 à 1100 Å de long et sont alignés parallèlement aux fibres de collagène (figure I-2). La faible taille de ces cristaux et leur nombre confèrent à la partie minérale de l'os naturel une grande surface spécifique (environ $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Cette dernière couplée à la présence de lacunes dans la structure des cristaux d'hydroxyapatite crée une interface très favorable aux échanges ioniques avec les fluides biologiques sursaturés en ions [Cazalbou'04].

Les ostéoclastes sont issus des cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules géantes de 100 µm de diamètre et multinucléées se trouvent au contact de la matrice osseuse minéralisée. En sécrétant des enzymes lysosomiales et des acides, elles sont responsables de la résorption osseuse. Grâce à leur structure polaire, les ostéoclastes s'attachent à la partie minérale de l'os créant une zone circulaire d'adhésion sous laquelle la résorption osseuse a lieu (figure I-2). La cavité osseuse s'élargit

de 7 à 9 μm par jour et progresse dans un sens déterminé notamment par les contraintes mécaniques à la vitesse de 40 à 50 μm par jour, réalisant ainsi une structure tunnelaire dans l'os [Kartsogiannis'04-Teitelbaum'00].

Les ostéoblastes ou cellules formatrices de l'os sont des cellules souches non spécialisées issues du mésenchyme. De manière générale, les ostéoblastes comblent les lacunes créées par les ostéoclastes en apposant une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice non minéralisée ou ostéoïde sera ensuite minéralisée à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé [Annaz'04-Kartsogiannis'04]. En fonction de leurs activités et de l'étape de différenciation cellulaire, ces cellules se répartissent en trois catégories principales. Les ostéoblastes actifs, cellules cuboïdes de 20 μm de diamètre et mononuclées, se caractérisent par une forte activité cellulaire : sécrétion d'enzymes (phosphatase alcaline principalement), synthèse et sécrétion du collagène de type I, des glycoprotéines et des facteurs de croissance de la matrice minérale de l'os. Les ostéoblastes matures ou ostéocytes, cellules fusiformes et aplaties, au noyau condensé et central, sont responsables de l'équilibre du calcium, de la formation de l'os et du maintien de la matrice osseuse. Les ostéoblastes épithéliaux ou ostéoblastes inactifs ont une activité métabolique très réduite et forment une couche de cellules à la surface de l'os.

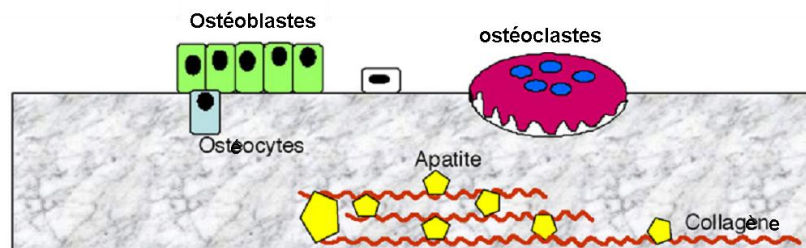


Figure I-2- La structure moléculaire et cellulaire simplifiée de l'os [Woodfield'02].

I-1-2- Le remodelage osseux

L'os est en renouvellement permanent grâce à l'action conjointe des ostéoclastes et des ostéoblastes. Le remodelage osseux est donc un processus physiologique permettant un renouvellement continu de la matrice osseuse. Ce processus est une unité fonctionnelle et mobile qui progresse dans le tissu osseux en faisant intervenir les ostéoclastes puis les ostéoblastes. Le cycle de remodelage osseux (figure I-3) commence par une phase dite d'activation pendant laquelle les ostéoclastes actifs se placent le long de la surface osseuse recouverte de cellules bordantes, fusionnent et initient la résorption de l'os ancien. Puis les ostéoclastes endocytent les tissus osseux creusant des lacunes de résorption. Les ostéoclastes ayant terminé la formation des lacunes, la phase d'intervention commence. Au cours de cette phase, les ostéoclastes subissent une apoptose et sont remplacés par les ostéoblastes. Les ostéoblastes actifs vont combler les cavités en synthétisant une trame protéique (ostéoïdes) au fond des lacunes. Cette trame protéique fixe les éléments calcium et phosphore sous

forme d'ions calcium et groupements orthophosphate. Ces ions vont ensuite interagir et former un complexe phosphocalcique qui sera éliminé vers la matrice pré-osseuse sous forme de cristaux d'apatite biologique et déposé au niveau des fibres de collagène [Doblaré'04].

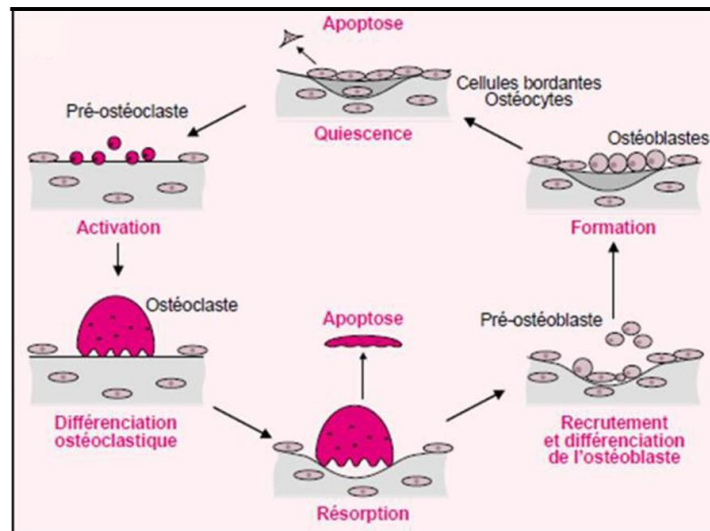


Figure I-3- Illustration du cycle de remodelage osseux [Marie'01]

I-2- Les substituts osseux

Suite à des lésions tissulaires, l'os peut se régénérer. Cependant, cette réparation spontanée n'est possible que dans le cas de défauts de petite taille, dite « non-critique ». Les fractures, dues à une chute ou à un accident, l'ostéoporose, les fragilités osseuses constitutionnelles ou encore la résection de tumeurs, de kystes ou de foyers infectieux, sont à l'origine de pertes de substances osseuses conséquentes. La régénération spontanée de l'os est, dans ces cas, insuffisante. Il est alors nécessaire de combler la cavité par un substitut osseux afin d'apporter un soutien mécanique à la zone traumatisée et fournir une surface favorisant la cicatrisation [Szpalski'02]. Les stratégies actuelles de reconstruction et de comblement des cavités osseuses consistent à employer des greffes ou bien des matériaux naturels ou synthétiques.

I-2-1- Les greffes osseuses

La technique usuelle pour le traitement des déficiences osseuses est l'utilisation de greffes d'os spongieux provenant soit du patient lui-même (autogreffe) soit d'un donneur (allogreffe).

Les autogreffes présentent des propriétés ostéoconductrices et ostéogéniques optimales, n'induisent pas de réponse immunitaire néfaste et diminuent les risques de transmission de maladies infectieuses. Bien qu'optimales pour la reconstruction osseuse, elles nécessitent un prélèvement du greffon ce qui provoque une douleur et une morbidité importantes même avec les nouvelles

techniques de prélèvement. Enfin, les quantités disponibles ne permettent pas le comblement de défauts osseux importants.

Les allogreffes, quant à elles, sont disponibles en plus grande quantité. Une étape préalable de congélation ou de lyophilisation du greffon réduit la réponse immunitaire du receveur après implantation. Cependant, bien que les procédures de prélèvement et de traitement des allogreffes aient permis de limiter les transmissions de maladies, les risques ne sont pas totalement éliminés. Les allogreffes présentent des qualités ostéoconductrices permettant la repousse osseuse mais leurs propriétés ostéoinductrices sont très limitées. Des matrices osseuses déminéralisées élaborées à partir d'allogreffes ont été développées. En leur associant par la suite des protéines non collagéniques, des facteurs de croissance et du collagène, elles ont conduit à un matériau présentant des propriétés ostéoinductrices intéressantes. Cependant cet os déminéralisé ne parvient pas à être un support favorable à la reconstruction osseuse [Betz'02-Boyce'99].

Face à toutes ces difficultés et limites, l'utilisation de matériaux synthétiques, dits biomatériaux, s'est développée pour le traitement des défauts osseux. Ces matériaux sont biocompatibles et peuvent être d'origine organique (polymères), minérale (métaux et céramiques) ou organo-minérale (composites). Le choix de l'implant et de ses propriétés chimiques, mécaniques et biologiques est dicté par les critères orthopédiques. Depuis la fin des années 80, de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées à la grande famille des phosphates de calcium [De Groot'87]. Ces composés, dont les compositions sont proches de la phase minérale de l'os, présentent un intérêt certain en chirurgie dentaire et orthopédique et plus particulièrement en comblement osseux.

I-2-2- Les phosphates de calcium

L'élaboration d'un substitut osseux doit prendre en compte deux critères généraux : la composition chimique et la présentation physique. La composition des phosphates de calcium est semblable à celle du minéral osseux, ce qui leur confère des propriétés telles que la bioactivité (interaction avec les tissus environnants conduisant à une liaison directe et forte et à une accélération des processus de cicatrisation tissulaire), la biorésorbabilité (résorption et remplacement du matériau par un tissu vivant) et l'ostéoconduction [LeGeros'02]. L'ostéoconduction est la propriété passive d'un matériau à promouvoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir des berges du tissu hôte. L'os vient se déposer à la surface du matériau ; sa croissance se fait alors par épitaxie à la surface de l'implant.

1-2-2-1- Présentation générale

Les sels de calcium de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) présentent diverses compositions chimiques et des structures cristallines très variées. La majorité des orthophosphates de calcium résultent de la neutralisation des différentes acidités de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) par l'oxyde

de calcium (CaO). Ces sels présentent des compositions chimiques et des structures cristallines très variées (tableau I-1). Les propriétés chimiques et biologiques des phosphates de calcium sont fortement influencées par leur composition, c'est-à-dire par leur rapport molaire Ca/P et par leur structure. Malgré les différences existant entre vitesse et mécanismes de résorption *in vivo* et *in vitro*, des essais en milieu aqueux permettent de comparer les solubilités des différents phosphates de calcium. De manière générale, la solubilité augmente lorsque le rapport molaire Ca/P du composé diminue (tableau I-2).

Orthophosphates de calcium	Abréviation	Formule chimique	Rapport Ca/P
Phosphate monocalcique <i>anhydre</i> <i>monohydraté</i>	MCPA MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50
Phosphate dicalcique <i>anhydre (monétite)</i> <i>dihydraté (brushite)</i>	DCPA DCPD	CaHPO_4 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Phosphate octocalcique <i>triclinique</i> <i>apatitique</i> <i>amorphe</i>	OCPt OCPa OCPam	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{2,5}(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{OH})_{0,5}$ $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,33
Phosphate tricalcique α ou β <i>apatitique</i> <i>amorphe</i>	TCP(α,β) TCPa ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,50
Hydroxyapatite phosphocalcique <i>stoechiométrique</i>	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Phosphate tétracalcique	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00

Tableau I-1- Les différents orthophosphates de calcium

Rapport Ca/P	Composé	Solubilité à 25°C (-log(K _s))	Solubilité à 25°C (g.L ⁻¹)
0,5	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O	1,14	~ 18
	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1,14	~ 17
1,0	CaHPO ₄ .2H ₂ O	6,59	~ 0,088
	CaHPO ₄	6,90	~ 0,048
1,33	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ .5H ₂ O	96,6	~ 0,0081
1,5	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25,5	~ 0,0025
	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28,9	~ 0,0005
1,5-1,67	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0 < x < 1)	~ 85,1	~ 0,0094
1,67	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	116,8	~ 0,0003
1,67	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	120,0	~ 0,0002
2,0	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	38–44	~ 0,0007

Tableau I-2- Solubilités des différents orthophosphates de calcium en milieu aqueux et à 25°C, en fonction de leurs rapports Ca/P [Dorozhkin'07]

1-2-2-2- L'hydroxyapatite phosphocalcique et le phosphate tricalcique bêta

a- Données cristallographiques et propriétés

L'hydroxyapatite phosphocalcique Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ notée HA, fait partie de la famille des « apatites ». Les apatites présentent la forme générique suivante : M₁₀(XO₄)₆Z₂, où M est un cation métallique divalent (Ca²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺, ...), XO₄ un groupement anionique trivalent (PO₄³⁻, AsO₄³⁻, VO₄³⁻, ...) et Z un anion ou un groupement anionique monovalent (OH⁻, F⁻, Cl⁻, ...). Ces composés cristallisent selon une structure hexagonale et acceptent un grand nombre de substitutions. Les paramètres de maille de l'hydroxyapatite stœchiométrique, dans le système hexagonal, sont : a = b = 9.418 Å, c = 6.884 Å, α = γ = 90°, β = 120° (figure I-4). Sa densité théorique est de 3,16 g.cm⁻³ [Kay'64].

Le phosphate tricalcique bêta β-Ca₃(PO₄)₂, noté β-TCP ou whitlockite cristallise, lui, dans le système rhomboédrique avec pour paramètres de maille a = 10,429 Å et c = 37,38 Å [Yashima'03b] (figure I-5).

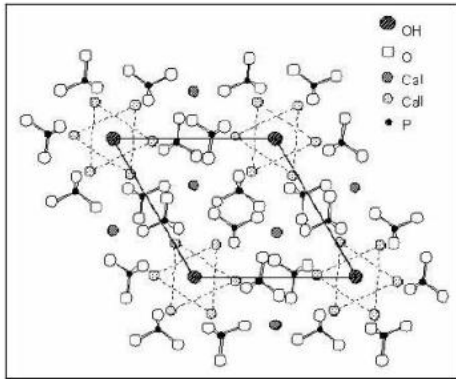


Figure I-4- Projections de la structure de l'hydroxyapatite sur le plan (001) [Kay'64]

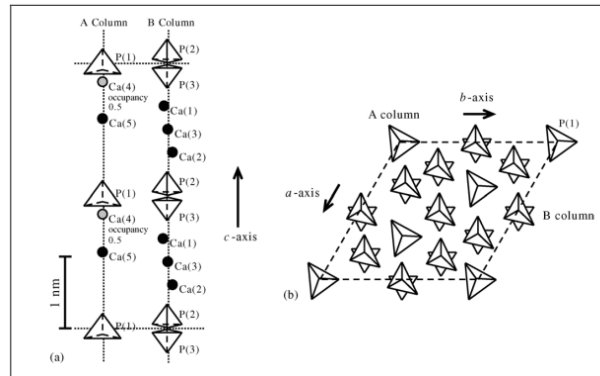


Figure I-5- (a) Configuration des colonnes A et B et (b) arrangement de ces colonnes au sein de la maille de β -TCP [Nakashima'06]

Les solubilités respectives de l'hydroxyapatite et du phosphate tricalcique beta sont très éloignées, induisant des comportements biologiques très différents.

L'hydroxyapatite stœchiométrique présente un très faible produit de solubilité dans l'eau – $\log(K_s) = 116,8$ à 25°C , correspondant à une solubilité (S) de $3 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ (tableau I-2) ce qui en fait le composé le plus stable et le moins soluble du système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$. De ce fait, la plupart des phosphates de calcium de rapport molaire Ca/P inférieur à 1,667 évolue en solution et dans des conditions de température et de pH bien définies vers l'hydroxyapatite [LeGeros'91]. L'hydroxyapatite biologique est une apatite sous-stœchiométrique, mal cristallisée et carbonatée. Ces imperfections cristallographiques induisent une solubilité plus élevée que celle de l'HA stœchiométrique [Hench'98]. Néanmoins, l'hydroxyapatite stœchiométrique présente une excellente capacité de liaison avec le tissu osseux ce qui en fait un matériau bioactif. De plus, elle est ostéoconductive : la repousse et la colonisation osseuses sont favorisées à son contact.

A cause de la forte solubilité du β -TCP ($-\log(K_s) = 28,9$) [Dorozhkin'07], les implants réalisés à partir de ce phosphate de calcium subissent une importante attaque par l'organisme. Ils sont dits biorésorbables. Les lacunes induites par la dissolution du matériau et la phagocytose des grains par les cellules multinucléées permettent une pénétration croissante des fluides au sein du matériau. Les pores ainsi créés permettent à la matrice extracellulaire calcifiante de s'insérer dans la microstructure. En raison de cette dissolution rapide, ils ne sont pas considérés comme des implants durables. Ils sont donc utilisés comme supports pour l'élaboration de structures implantables biodégradables ou la libération contrôlée de principes actifs [Klein'85].

b- Synthèse

Les phosphates de calcium peuvent être synthétisés par voie sèche ou par voie humide. La pureté, la morphologie ainsi que le degré de cristallinité des produits obtenus diffèrent selon la méthode employée.

La voie sèche consiste en des réactions solides/solides réalisées à haute température ou par broyage. Les poudres obtenues par réaction à hautes températures ($T > 1000^{\circ}\text{C}$) présentent des hétérogénéités de compositions, de formes et de tailles. Le contrôle de la composition chimique après calcination nécessite souvent une correction par ajout d'un des réactifs suivi d'un nouveau cycle thermique. C'est une méthode de préparation coûteuse en énergie, peu reproductible et limitée à de très petites quantités de produit [Famery'94]. La préparation de poudre d'HA, par exemple, par broyage ou mécanosynthèse [Silva'03], permet de diminuer la taille des particules des réactifs et d'augmenter leurs surfaces spécifiques. La formation de l'hydroxyapatite est alors due à l'interaction des particules entre elles. Cette méthode est moins coûteuse en énergie mais reste lente (temps de broyage de plusieurs heures) et présente des risques de pollution de la poudre (alumine ou zircone issue des billes de broyage).

Les synthèses en voie humide consistent à mettre en contact en milieu liquide des précurseurs des éléments calcium et phosphore, à température et pH contrôlés. Parmi les méthodes employées on trouve : la synthèse par neutralisation de l'acide phosphorique [Trombe'72], la synthèse par double décomposition [Jarcho'76], la synthèse hydrothermale [Liu'03] ou encore des procédés sol-gel [Liu'01]. Ces méthodes conduisent à des précipités qui sont séchés, le gâteau obtenu est ensuite broyé et la poudre sèche calcinée si besoin.

Les synthèses d'hydroxyapatite stœchiométrique ($\text{Ca/P} = 10/6$) en milieu aqueux peuvent conduire à des composés non-stœchiométriques suite à l'introduction dans le réseau cristallin d'ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} ou carbonates CO_3^{2-} . Le produit de synthèse présentera alors un léger écart par rapport au rapport molaire de l'HA stœchiométrique : ce sera soit une HA déficitaire en calcium ($\text{Ca/P} < 10/6$), soit une HA avec un excès de calcium ($\text{Ca/P} > 10/6$) [Raynaud'02]. Après calcination, l'HA déficitaire en calcium conduira à un mélange HA/ β -TCP et l'HA présentant un excès de calcium conduira à un mélange HA/CaO. En revanche, le β -TCP ($\text{Ca/P} = 3/2$) ne peut pas être obtenu directement par précipitation en voie humide. Le produit obtenu est un phosphate tricalcique apatitique de formule $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})_n\text{H}_2\text{O}$. Néanmoins, la synthèse du TCP apatitique, qui est en fait une HA déficitaire en calcium de type $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ avec $x=1$, est envisageable par un mode de synthèse classiquement utilisé pour l'HA stœchiométrique. Ce n'est qu'après un traitement thermique au-dessus de 700°C qu'il y aura formation du phosphate tricalcique anhydre cristallisé $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par condensation des ions hydrogénophosphates [Heughebaert'77-Destainville'03b]. Comme dans le cas de l'hydroxyapatite, un faible écart par rapport à la valeur $\text{Ca/P} = 3/2$ engendrera l'apparition d'une phase secondaire lors d'un traitement thermique. Si le rapport Ca/P est supérieur à $3/2$, la phase secondaire sera de l'hydroxyapatite, s'il lui est inférieur ce sera du pyrophosphate de calcium $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (CPP) [Destainville'03a].

La figure I-6, présente la composition chimique de poudres de phosphate de calcium de rapport molaire Ca/P variable en distinguant les résultats d'analyses de composition sur poudre brute de synthèse par précipitation et après calcination à 1000°C pendant 15 heures (traitement thermique correspondant à la norme utilisée pour la caractérisation des phosphates de calcium dans ce système [Afnor'08]).

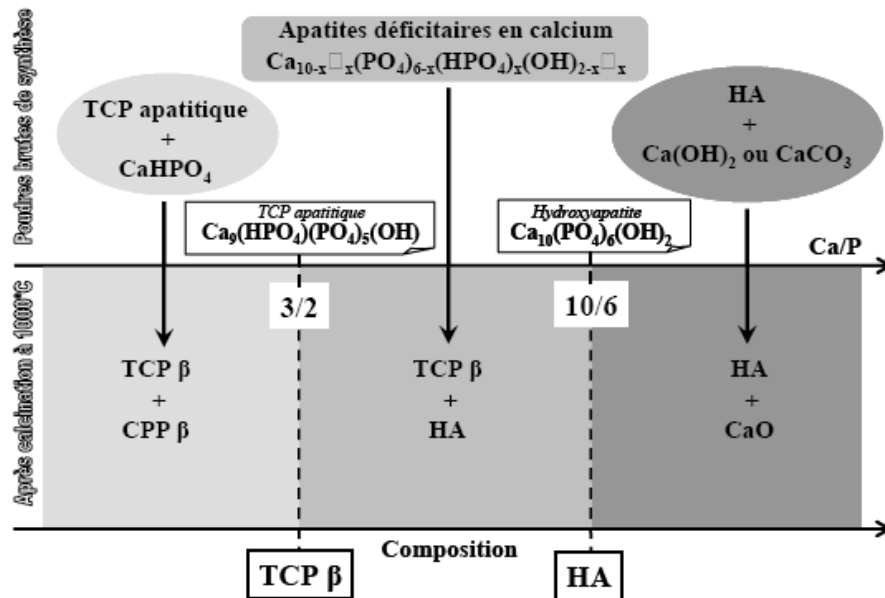


Figure I-6- Composition chimique de poudres de phosphate de calcium de rapport molaire Ca/P variable, brutes de synthèse par voie aqueuse et après calcination [Destinville'06]

1-2-2-3- Applications en comblement osseux

Les propriétés intrinsèques d'un substitut osseux ne sont pas les seuls critères influençant la reconstruction osseuse. En effet, les propriétés telles que la biocompatibilité, la bioactivité et la biorésorbabilité sont conditionnées par la composition chimique du matériau mais aussi par sa forme et sa structure. L'ostéointégration des matériaux de comblement est fortement liée à la présence d'un réseau de pores interconnectés qui favorisent la colonisation cellulaire. Plus précisément, la structure physique d'un substitut osseux nécessite la présence de deux types de porosité ayant une influence distincte sur les processus biologiques se déroulant au contact de l'implant :

- la microporosité (diamètre de pores $< 10 \mu\text{m}$) intervient dans les phénomènes d'échange ionique avec les fluides biologiques,
- la macroporosité (diamètre de pores $\geq 100 \mu\text{m}$) est un facteur déterminant pour l'invasion vasculaire et la colonisation cellulaire [Habraken'07-LeGeros'08].

Afin de répondre au mieux à ces critères, les matériaux phosphocalciques de comblement sont fabriqués sous trois formes principales : les ciments, les blocs poreux et les granules (figure I-7).

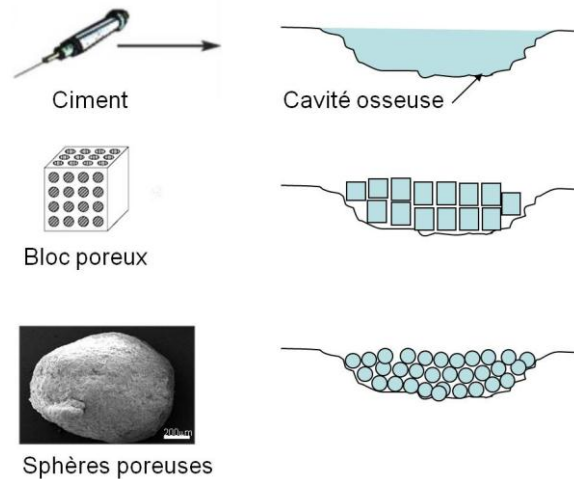


Figure I-7- Différentes présentations des matériaux de comblement à base de phosphate de calcium

Les ciments phosphocalciques (CPC) sont disponibles sous forme de pâtes injectables. Ils sont généralement obtenus à partir du mélange d'une phase solide, constituée d'un ou plusieurs composés de phosphate de calcium, et d'une phase liquide, telle que de l'eau pure, une solution acide, basique ou tamponnée. Les réactifs solides se dissolvent dans le milieu liquide jusqu'à sursaturation de la solution, puis précipitent sous forme d'un phosphate de calcium moins soluble, l'hydroxyapatite. Les cristaux néoformés croissent en s'enchevêtrant assurant ainsi la cohésion et les propriétés mécaniques du ciment. Injectés sous forme pâteuse, les CPC rendent les actes chirurgicaux très peu invasifs et permettent le comblement de cavités osseuses de géométries complexes [Bohner'05-Ginebra'06]. Bien que microporeux, les ciments phosphocalciques ne présentent généralement pas de macropores, ce qui limite le passage des cellules et donc la repousse osseuse au cœur du substitut.

Les blocs poreux et les grains en phosphate de calcium sont fabriqués par différents procédés céramiques de mise en forme. Ces procédés sont détaillés en partie I-3 de ce chapitre. Ils permettent d'intégrer à la fois des macroporosités et des microporosités au sein du matériau conduisant ainsi à des structures poreuses en 3 dimensions favorisant la vascularisation et la colonisation osseuse. La forme prédéfinie et statique des blocs limite leur utilisation au remplissage de cavités osseuses « larges » et de forme régulière. Par contre, les cavités osseuses de géométries complexes pourront être comblées par des sphéroïdes poreux de petit diamètre (< 1 mm). Dans ce cas, la macroporosité interconnectée est assurée par les espaces inter-granulaires résultant de l'empilement des objets dans la cavité à combler, la porosité intra-granulaire des grains assurant, quant à elle, le passage des fluides biologiques [Chevalier'10-Cunin'00-Descamps'09].

I-3- Méthodes d'élaboration des substituts phosphocalciques poreux

Les procédés les plus fréquemment utilisés dans le domaine des biomatériaux pour générer de la porosité au sein des céramiques sont basés sur la préparation d'un mélange de poudre céramique avec un agent porogène. Ce mélange est ensuite mis en forme et le réseau de pores est obtenu par l'élimination du porogène. La préparation du mélange poudre/porogène est dictée par le choix du

procédé de mise en forme, celui-ci pouvant se faire soit par moulage, soit par voie solide. Les porogènes insolubles seront éliminés par traitement thermique et les additifs solubles, e.g. les cristaux de sel ou les fibres d'alcool polyvinylique, par dissolution [Chevalier'08a] (tableau I-3).

Type de procédé	Procédé par moulage		Procédé en voie solide
Méthode	Directe (sans frittage)		Indirecte (avec frittage)
Nature du porogène	Gaz	Liquide	Solide
Voie d'élimination du porogène	Chauffage (Sublimation, évaporation, fusion, calcination)		Dissolution (En cours de procédé, <i>in situ</i>)

Tableau I-3- Procédés de génération de porosité au sein des céramiques [Chevalier'08a]

Le paragraphe suivant est consacré aux méthodes d'élaboration des biocéramiques phosphocalciques poreuses par moulage et par voie solide, en se concentrant sur les procédés indirects, c'est-à-dire nécessitant un traitement thermique, et utilisant des porogènes organiques. Ces procédés permettent d'obtenir un réseau de micropores et de macropores interconnectés.

I-3-1- Les procédés par moulage

L'élaboration des biocéramiques poreuses par moulage consiste premièrement à préparer une barbotine par dispersion de la poudre céramique dans une phase liquide à laquelle sera ajouté un agent porogène. La barbotine est ensuite coulée dans un moule puis, l'ensemble est séché et fritté afin d'éliminer le porogène et améliorer les propriétés mécaniques des céramiques.

Selon la nature du porogène utilisé, les procédés par moulage peuvent être divisés en deux catégories : les procédés par dispersion et les procédés par mousse.

a- Les procédés par dispersion

Ces procédés consistent à disperser un agent porogène solide (sous forme de particules) ou liquide dans une barbotine céramique. La barbotine est ensuite moulée, séchée et frittée [Chevalier'08a-Studart'06].

Les porogènes solides, comme l'amidon [Lyckfeldt'98-Prabhakaran'07] ou les billes de polymère (PMMA) [Chen'05a-Chen'05b-Descamps'09], conduisent à la formation d'un réseau de macropores interconnectés *via* des micropores. La porosité totale, la morphologie et la taille des pores sont modulables par la quantité et la morphologie des particules porogènes utilisées, cependant l'homogénéité de la répartition des pores est difficile à contrôler. Parmi les porogènes liquides on trouve principalement l'eau qui est éliminée par lyophilisation avant l'étape de frittage. Cette technique permet également d'obtenir un réseau de macropores interconnectés [Deville'06]. Enfin, d'autres

procédés utilisent l'immiscibilité de certains liquides pour fabriquer des grains sphériques microporeux [Bohner'05].

Avec le procédé d'hétérocoagulation, qui consiste à mélanger deux suspensions de charge opposée, la distribution des pores est plus régulière. En effet, le mélange de la suspension de sphères porogènes (core) à la suspension de nanoparticules de céramique (shell) conduit à la formation d'une structure « core-shell », c'est-à-dire au dépôt des particules de céramique à la surface du porogène par interactions électrostatiques [Chotard-Ghodsni'a'09].

b- Les procédés par mousse

L'intégration du réseau de pores se fait à partir d'une mousse. Celle-ci est produite soit au cours de la préparation de la barbotine par des agents moussants, soit par l'introduction d'une mousse polymère (réplication) dans la barbotine.

Dans le cas de l'intégration d'agents moussants dans la barbotine, l'agitation vigoureuse du mélange conduit à la formation de bulles, stabilisées grâce à des agents tensioactifs. Le mélange est ensuite séché, puis fritté. La porosité totale intégrée par cette méthode dépend de la nature de l'agent moussant, de la quantité introduite et de la vitesse d'agitation. Le réseau de pores ainsi créé est un réseau interconnecté de micro- et de macropores sphériques [Jones'03-Lee'03-Sepulveda'99]. L'imprégnation d'une mousse organique par une barbotine céramique nécessite, quant à elle, l'ajout de liants afin de contrôler la viscosité de la barbotine. Ces liants permettent de maintenir la continuité de la barbotine sur la mousse, de limiter le retrait au séchage et d'éviter l'effondrement de la céramique pendant le traitement thermique. Les mousses les plus couramment utilisées sont en cellulose [Fabbri'95-Mastrogiacomo'06] ou en polyuréthane [Herath'05-Sepulveda'99]. Les céramiques obtenues par ce procédé sont des réplicats des mousses et ont donc un réseau de macropores interconnectés dont les formes et les tailles dépendent de la forme initiale de la mousse organique.

I-3-2- Les procédés par voie solide

De manière générale, les procédés en voie solide consistent à mélanger une poudre céramique avec un agent porogène lui-même sous forme de poudre. Le mélange est ensuite mis en forme et traité thermiquement afin d'éliminer le porogène et de consolider la pièce par frittage. Ces procédés conduisent à des objets de formes géométriques simples (pastilles, blocs, granules,...) et peuvent être divisés en trois catégories : les procédés par compaction, les procédés par extrusion et les procédés par granulation. Le procédé de granulation humide ayant été utilisé pour le travail présenté ici, il sera plus particulièrement développé.

a- Les procédés par compaction

Dans ce premier cas, le mélange poudre/porogène est mis en forme à l'aide d'une presse uniaxiale ou isostatique, à température ambiante ou à haute température, avant de subir le traitement thermique qui permettra d'éliminer le porogène et de consolider la céramique obtenue [Chevalier'08a]. Les agents porogènes utilisés sont principalement de nature organique : naphtalène [Bouler'96-Tancret'06], saccharose [Wang'05], poly(méthylmetacrylate) (PMMA) [Uchida'84-Zhang'07], dextrine [Zeng'07], acide stéarique [Zhang'07] ou encore de la cire [Prado Da Silva'02]. La taille et la morphologie des macropores ainsi obtenus sont proches de la taille et de la morphologie de l'agent porogène, et leur densité est modulée par la quantité de porogène utilisé. Ces macropores sont interconnectés *via* les micropores induits par le traitement thermique [Chevalier'08a].

b- Les procédés par extrusion

Une pâte constituée du mélange poudre céramique/porogène additionnée d'un liant est extrudée préalablement au traitement thermique. Les porogènes utilisés dans ce procédé sont de nature organique (nylon [Isobe'06a], polyvinyle de butyral (PVB) [Krajewski'00], polyvinyle acétate (PVAC) [Isobe'07]) ou inorganique (carbone [Isobe'06b]). Il est impératif qu'ils soient sous forme de fibres (fibres de Nylon ou de carbone) ou qu'il s'agisse de polymères déformables (PVB ou PVAC) afin de pouvoir s'orienter ou de se déformer dans le sens de l'extrusion. De ce fait, le réseau de pores obtenu est constitué de cylindres uniformes, de taille identique, orientés uni-directionnellement et interconnectés par des micropores [Chevalier'08a].

c- Les procédés par granulation

Le procédé de granulation est une méthode traditionnellement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire et la détergence. Dans son usage classique, ce procédé est destiné à améliorer les propriétés d'un mélange de poudres, par assemblage des particules primaires en agglomérats. Le but est d'augmenter la masse volumique apparente, d'assurer l'homogénéité des mélanges, de garantir la manipulation des produits formés et d'améliorer certaines propriétés du mélange telles que l'augmentation de l'aptitude à la compression des grains [Knight'01]. La granulation est réalisée soit par voie sèche, soit par voie humide.

La granulation en voie sèche, consiste au compactage de la poudre inorganique avec un liant organique, puis au broyage/concassage des agrégats formés par l'application d'une force mécanique durant la compaction. Enfin un tamisage/calibrage permet d'homogénéiser la distribution granulométrique des agglomérats [Lerk'74].

La formation des grains par granulation en voie humide se produit, quant à elle, par l'addition d'un liquide sur le mélange de poudre. Un liant permettant la cohésion des grains par la création de liaisons physiques ou chimiques, est introduit sous forme dispersée ou dissout dans le liquide de granulation [Chevalier'09].

La granulation humide est traditionnellement décrite comme la combinaison de trois étapes: mouillage et nucléation, croissance et consolidation, attrition et rupture (figure I-8). La première étape de la formation des grains (mouillage et nucléation), déterminante pour l'ensemble du processus de granulation, est générée par l'addition du liquide de mouillage au matériau sec et à sa distribution. La qualité du mouillage dépend de la répartition du liant solide dans le mélange de poudre ou de la dispersion de la solution liante, qui dépend elle-même des caractéristiques physicochimiques des matières premières, des propriétés rhéologiques de la solution liante et des modalités d'incorporation du liant. La deuxième étape qu'est la croissance des grains débute lorsque les nucléi, sous l'effet des collisions, s'assemblent. Si tous les agglomérats contiennent une quantité identique de liant, leurs propriétés physiques sont identiques et la distribution granulométrique est étroite. En revanche, si le liant est dispersé de façon aléatoire au sein du mélange de poudres, certains nucléi sont plus saturés que d'autres et leur croissance devient préférentielle. Enfin, la granulation est le résultat de la compétition entre la croissance des agglomérats et leur rupture sous l'effet des conditions mécaniques. La cassure des grains humides dans le granulateur peut être un moyen de contrôler la granulométrie des grains, notamment dans le cas des granulateurs à haut cisaillement [Iveson'98]. A l'issue de l'étape de granulation, une sphéronisation consistant à maintenir l'agitation après l'ajout complet du liquide de mouillage, peut être mise en œuvre afin de conférer aux grains une forme sphérique [Chevalier'09].

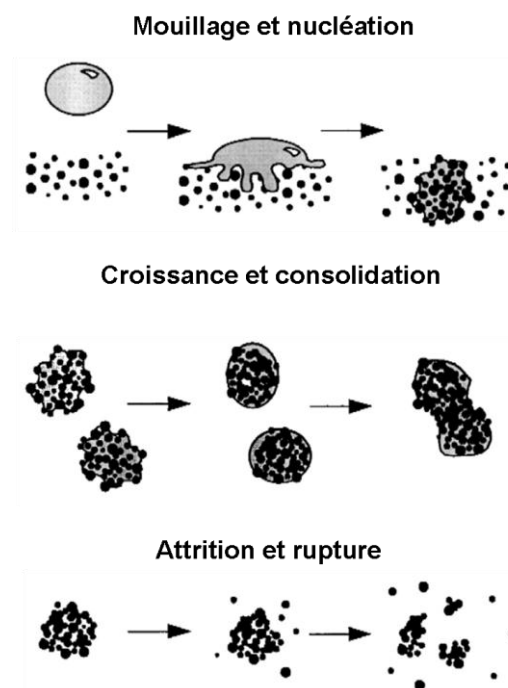


Figure I-8- Représentation schématique des différents stades de la granulation [Iveson'98]

La granulation humide peut être réalisée selon des procédés multiphasiques, pour lesquels mélange, granulation et séchage sont effectués dans des appareils différents [Bock'01-Faure'99], ou

monophasiques (single pot) combinant toutes les étapes dans un même appareil [Duschler'95-Stahl'00].

En résumé, les céramiques phosphocalciques poreuses constituent une catégorie de substituts osseux largement utilisée. Leurs propriétés biologiques sont modulées par leurs compositions, leurs structures et leurs solubilités. Elles peuvent se présenter sous différentes formes, leurs propriétés macro- et microstructurales dépendant des procédés d'élaboration utilisés.

I-4- Le traitement localisé des pathologies osseuses par des substituts fonctionnalisés

Les biomatériaux de substitution osseuse sont de plus en plus associés à des molécules actives afin de conférer au matériau de comblement une fonction thérapeutique supplémentaire. Cette forme galénique apparaît comme un dispositif d'administration localisée, continue et contrôlée, d'un principe actif [Vallet-Regí'06]. Le système de délivrance d'une molécule active est également connu sous le nom de « Drug Delivery System » ou « DDS ».

L'intérêt de la libération locale d'une molécule active provient du faible taux de vascularisation autour du tissu osseux traumatisé. Ce problème peut provenir du traumatisme initial (lésion importante des artères nourricières ou métaphysaires) ou de l'acte chirurgical (lésions iatrogènes). Les voies classiques d'administration d'un principe actif (voies orale ou parentérale) véhiculent le médicament par le sang en le diffusant dans l'ensemble du corps. Or, lorsque la cible est le tissu osseux, une augmentation des doses est nécessaire pour que la concentration du principe actif soit suffisante dans la zone exigeant le traitement, ce qui peut engendrer une toxicité systémique du principe actif [Wu'06]. En revanche, un DDS permet d'administrer la molécule thérapeutique d'une manière localisée et la dose nécessaire est présente majoritairement dans la zone à traiter. Ainsi, ce type d'administration permet de limiter les effets secondaires de la molécule active. La cinétique de libération est déterminée par la dissolution du principe actif dans les fluides biologiques circulant au niveau de l'implant et par la résorption éventuelle de ce dernier [Porter'09].

Les pathologies particulièrement visées par ce type de traitement sont les infections et les cancers du tissu osseux mais également les pathologies musculo-squelettiques qui touchent une population de plus en plus nombreuse en raison de l'augmentation de la durée de la vie. En effet, en 2005 aux Etats-Unis par exemple [Wang'08], environ 10 millions de personnes de plus de 50 ans étaient atteintes d'ostéoporose et 34 millions présentaient une masse osseuse faible (ostéopénie) laissant présager une fracture vertébrale, de la hanche ou du poignet ; et un adulte américain sur trois était touché par une arthrite. Les conséquences de ces pathologies sont importantes en termes de mortalité, de morbidité mais également de coût [Cummings'02] : perte d'autonomie, douleurs, difficultés fonctionnelles, incidence négative sur le moral, dépenses d'hospitalisation et de soins ... Tout ceci justifie l'amélioration de la prise en charge thérapeutique avec en outre le développement de systèmes de libération localisée de molécule active au niveau du tissu osseux.

1-4-1- Infections osseuses

Malgré tous les efforts faits dans le domaine de la prévention des infections, celles-ci demeurent toujours un réel problème avec potentiellement de graves conséquences pour le patient atteint.

L'infection des tissus osseux ou ostéomyélite, survient principalement suite à une fracture ouverte mais elle peut également être d'origine hématogène. L'infection se fixe sur certaines parties de l'os, qui peuvent être en voie de nécrose, et peut être responsable d'un retard ou d'une inhibition de la cicatrisation osseuse. L'infection engendre l'inflammation, intensifie la résorption osseuse et induit une nécrose supplémentaire de l'os.

L'infection peut également apparaître après l'implantation d'une prothèse. Certaines espèces bactériennes sont capables de s'attacher aux surfaces d'implants et de former une couche protectrice, dite bio-film, extrêmement résistante au système immunitaire et aux antibiotiques. Ces bio-films sont considérés comme la cause principale des infections associées aux dispositifs médicaux.

Quelle que soit l'origine de l'infection (hématogène, post-opératoire, post-traumatique ou de contiguïté), son traitement associe un traitement chirurgical, visant à exciser les zones nécrosées, à un traitement antibiotique adapté. La pharmacocinétique et la pénétration des antibiotiques dans l'os sont mal connues chez l'homme et dépendent de chaque molécule. En général, les concentrations osseuses atteignent 20 à 40% des concentrations sériques (tableau I-4), mais dans l'os nécrosé, dépourvu de vascularisation, les concentrations d'antibiotiques ne sont pas détectables. Face aux voies usuelles d'administration des médicaments qui obligent donc à avoir recours à de fortes doses d'antibiotiques pour éradiquer les microorganismes pathogènes, les systèmes de délivrance localisée présentent un réel potentiel thérapeutique.

Comme illustré sur la figure I-9 [Campoccia'10], la conception d'un tel système doit prendre en considération quatre éléments majeurs qui interagissent mutuellement quand le biomatériau chargé en antibiotique est implanté : la zone d'implantation, la nature du biomatériau, la molécule active et la bactérie à l'origine de l'infection. Le choix de l'antibiotique associé au biomatériau dépend en premier lieu du microorganisme à éradiquer, mais également du type de traitement (curatif ou préventif) et de la compatibilité physique et chimique entre la molécule active et le biomatériau. Le tableau 1-5 récapitule les principaux antibiotiques candidats pour une délivrance locale à partir de biomatériaux [Campoccia'10].

Famille	Molécule (IV)	Concentration antibiotique Os/sérum (%)
β-lactamines	Pénicillines	10 à 30
	Céphalosporines	10 à 30
	Imipenème	Non précisé mais faible
	aztréonam	20
Glycopeptides	Vancomycine	10 à 30
	Teicoplanine	10 ou plus
Cyclines		30 à 100
Clindamycine		30 à 50
Rifampicine		40
Acide fusidique		50
Fosfomycine		15 à 20
Aminosides		30
Trimethoprim		20 à 50
Quinolones	Péfloxacine	30 à 250
	Ciprofloxacine	30 à 50
	Ofloxacine	30 à 50
	Levofloxacine	25 à 100

Tableau I-4- Pénétration osseuse des antibiotiques [Zeller'06], lignes grises : antibiotiques à bonne pénétration osseuse.

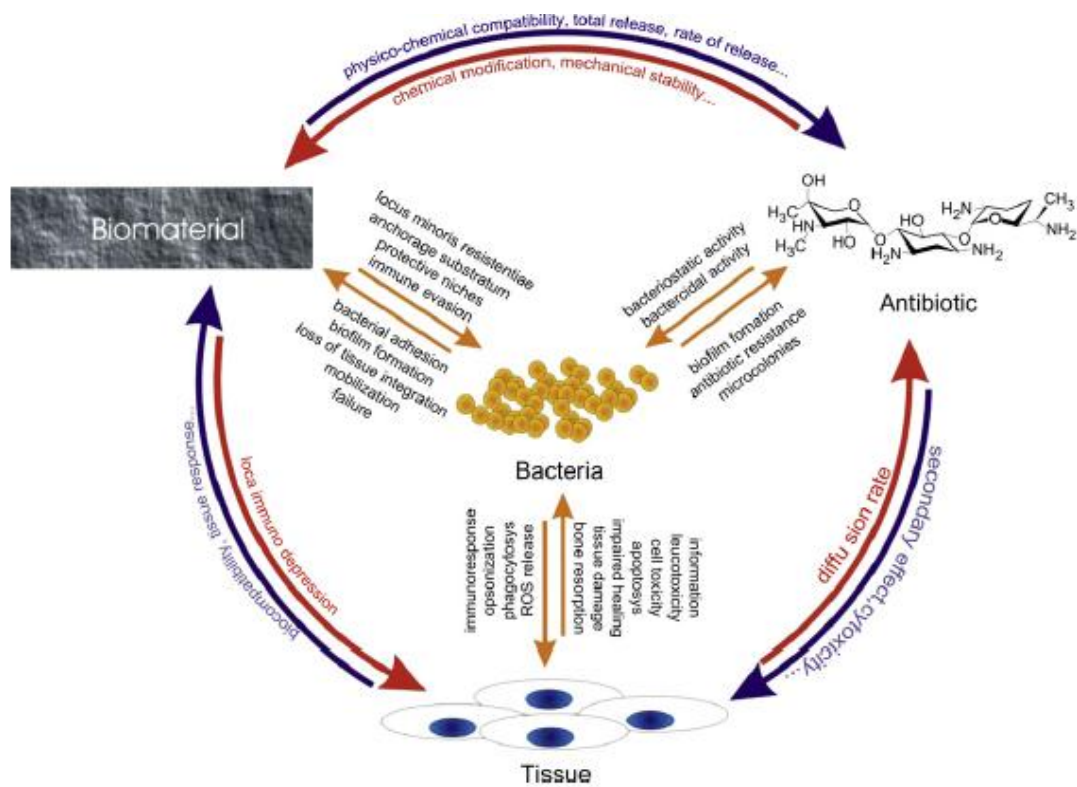


Figure I-9- Complexité des interactions entre la zone d'implantation et un biomatériau chargé en antibiotique [Campoccia'10]

Antibiotique	Spectre d'activité	Bactéries sensibles	Stabilité à la chaleur
β -lactamines	Etroit	Gram+ et quelques Gram-	Faible pour plusieurs céphalosporines : diminution de l'activité après 1 sem à 37°C
Céfazolines	Etroit	Gram+ et quelques Gram-	oui
Céfuroxime	Etendu	Gram+ et Gram-	oui
Aminoglycosides Gentamycine	Large	Gram- et plusieurs Gram+	oui
Tobramycine	Large	Gram- et plusieurs Gram+	oui
Tétracycline	Large	Gram+ et Gram-	oui
Lincosamides Clindamycine	Moyen	Gram+ et Gram- anaérobies	oui
Lincomycine	Moyen	Gram+	oui
Macrolides Erythromycine	Moyen	Gram+ et quelques Gram-	oui
Polymyxine	Etroit	Gram+ et quelques Gram-	oui
Glycopeptides Vancomycine	Etroit	Gram+	Diminution de 40% de l'activité en 3 sem à 37°C

Tableau I-5- Candidats pour une libération locale à partir de biomatériaux [Campoccia'10]

Bien que représentant une alternative intéressante, ces systèmes de délivrance ne sont pas sans risques et inconvénients [Campoccia'10-Zilberman'08]. En particulier, la diffusion prolongée de l'antibiotique à une concentration inférieure à la concentration inhibitrice, à l'issue de la diffusion massive initiale, peut favoriser l'émergence de mutants résistants. Par ailleurs, la survenue de réactions allergiques ne peut être totalement écartée. Ces risques conduisent certains auteurs à réserver l'emploi de ces systèmes de délivrance à des situations cliniques où la souche bactérienne a pu être identifiée avant l'implantation, de manière à choisir l'antibiotique en fonction de la sensibilité des bactéries visées [Campoccia'10].

1-4-2 Cancers du tissu osseux

Le traitement des cancers du tissu osseux associe généralement une chimiothérapie à l'ablation de la tumeur osseuse, afin de traiter le tissu en cas de résection insuffisante mais également en vue de prévenir la dissémination de métastases. Cependant l'efficacité de la chimiothérapie est souvent limitée par la toxicité des agents anti-cancéreux. Ainsi les doses et les fréquences des traitements

sont dépendantes de la toxicité de ces molécules sur les tissus hématopoïétiques et sur les muqueuses buccales et gastro-intestinales [Lebugle'02].

L'incorporation dans des DDS de molécules telles que le methotrexane [Itokazu'99-Itokazu'98-Lebugle'02] ou des anti-tumoraux à base de platine [Barroug'02-Netz'01] permettrait d'améliorer l'efficacité du traitement et de réduire le risque de récurrence après le curetage de la tumeur, en maintenant une concentration locale élevée sur une longue période de temps, tout en limitant les effets secondaires de la chimiothérapie. Dans le cas particulier du méthotrexate, une libération prolongée est recherchée car les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la durée du traitement qu'à la dose administrée [Lebugle'02].

1-4-3- Pathologies musculo-squelettiques

Le vieillissement de la population entraîne une prévalence des pathologies musculo-squelettiques, dont essentiellement l'ostéoporose et les pathologies inflammatoires.

a- **Ostéoporose** [Lin'96]

L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une fragilité excessive du squelette, due à une diminution de la masse osseuse et à l'altération de la microarchitecture osseuse. Elle apparaît à partir de 50-60 ans, surtout chez les femmes ménopausées. Durant toute leur vie les hommes perdent environ 20 à 30% de leur masse osseuse et les femmes 30 à 40%. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, l'ostéoporose devient un problème médical et socio-économique majeur, qui nécessite le développement de traitements préventifs et curatifs.

La solidité de l'os résulte d'un équilibre subtil entre les ostéoblastes, qui solidifient l'os, et les ostéoclastes, qui les fragilisent. Une activité dominante des ostéoclastes conduit à l'ostéoporose. Les principales molécules disponibles pour le traitement de cette pathologie sont les bisphosphonates, qui présentent une aptitude à inhiber la résorption osseuse. Bien que leurs propriétés physico-chimiques soient semblables, l'efficacité de ces bisphosphonates diffère remarquablement comme l'indique le tableau I-4 :

Bisphosphonate	50% inhibition <i>in vitro</i> (mol/L)	Aptitude relative	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Etidronate	1×10^{-6}	1	1
Clodronate	1.5×10^{-7}	8	10
Pamidronate	2×10^{-9}	550	100
Alendronate	2×10^{-9}	700	700
BM 21.0955	3.5×10^{-10}	5000	4000

Tableau I-4- Aptitudes *in vitro* et *in vivo* des bisphosphonates à inhiber la résorption osseuse [Lin'96]

Pour améliorer la biodisponibilité de toutes ces molécules, des dispositifs d'administration localisée dans le tissu osseux peuvent être envisagés. En effet, il peut être mentionné ici la biodisponibilité très limitée des bisphosphonates administrés par voie orale (< 3%) en raison de leur faible lipophilie [Lin'96]. Par exemple, Faucheu *et al* ont démontré l'efficacité *in vitro* du zoledronate chargé sur une apatite déficiente en calcium à inhiber l'activité des ostéoclastes [Faucheu'09]. Le pamidronate libéré à partir de grains d'hydroxyapatite a également permis de réduire le nombre d'ostéoclastes *in vitro* [Seshima'06].

La calcitonine, en se liant sur les récepteurs des ostéoclastes, est également efficace pour réduire la résorption osseuse. Diverses études ont en effet démontré son action lorsqu'elle est administrée par voie parentérale ou nasale [Arkfeld'05]. Enfin diverses thérapies hormonales (Tamoxifene, Raloxifene, hormone PTH) sont également proposées.

b- Pathologies inflammatoires [Arkfeld'05-Carli'09-Gabay'07-Wang'08]

30% des sujets entre 45 et 65 ans et 70% des personnes de plus de 65 ans sont atteints d'arthrose. Cette pathologie se situe ainsi au deuxième rang des maladies chroniques. Les maladies ostéoarticulaires représentent 6,2% des dépenses de santé en France. Cliniquement les pathologies inflammatoires se classent en trois groupes :

- Les pathologies dysimmunitaires (la polyarthrite rhumatoïde, les spondylarthropathies) : ces maladies auto-immunes systémiques sont caractérisées par une réaction inflammatoire dirigée contre des constituants cellulaires ou tissulaires, liée à une réponse immunitaire anormale définie comme « auto-agressive »
- Les arthropathies microcristallines : de nombreux types de microparticules sont décrits chez l'homme : microcristaux d'urate monosodiques à l'origine de la goutte, microcristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté impliqués dans la chondrocalcinose articulaire, microcristaux d'apatite ou hydroxyapatite et autres cristaux rares
- L'arthrose : longtemps considérée comme une fatalité liée à la vieillesse, l'arthrose est aujourd'hui reconnue comme une pathologie à part entière, caractérisée par un ensemble de désordres aboutissant à un défaut structural et fonctionnel d'une ou plusieurs articulations.

La prise en charge globale des patients atteints de pathologies inflammatoires articulaires consiste en une association de traitements pharmacologiques, non pharmacologiques et si nécessaires chirurgicaux. Les traitements médicamenteux associent souvent quatre grandes classes de molécules actives :

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)
- Les antalgiques
- Les corticostéroïdes
- Les traitements de fond conventionnels (hydroxychloroquine, sulfasalazine...) et les biothérapies dirigées contre une cible spécifique de la réponse immunitaire.

Les traitements par les voies usuelles d'administration ne sont pas toujours suffisants et nécessitent souvent une administration localisée conjointe par exemple des injections intra-articulaires [Fernandez-Carballido'04]. Cependant la demi-vie dans le liquide synovial des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac, ibuprofène par exemple) est courte ce qui oblige à des injections fréquentes pour maintenir une concentration intra-articulaire suffisante.

Ces dernières années, de grandes avancées ont été faites dans la connaissance de la biologie du tissu osseux, conduisant à l'émergence de nouvelles molécules actives sur des cibles moléculaires spécifiques. Cependant la plupart de ces nouvelles molécules manquent de spécificité tissulaire et provoquent des effets secondaires importants. Le développement de systèmes de délivrance localisée (« Drug Delivery System ») dans l'os atteint, présente dans ce cadre une possibilité d'optimisation de la biodistribution et de la pharmacocinétique de ces molécules pour un traitement plus efficace.

I-5- Développement d'un « Drug Delivery System » : système combiné biocéramique phosphocalcique poreuse/principe actif

Le développement et le contrôle d'un « Drug Delivery System » nécessitent une connaissance approfondie des propriétés physico-chimiques respectives du support poreux et du principe actif mais également une maîtrise des paramètres du procédé d'incorporation de la molécule thérapeutique. En effet, l'adsorption et la mise à disposition ultérieure de la molécule active dépendent non seulement de son affinité pour le support mais également des conditions expérimentales lors du chargement. Ainsi une revue bibliographique a permis de mettre en lumière les principaux paramètres influençant les caractéristiques d'un DDS élaboré par adsorption d'une molécule active sur un support phosphocalcique poreux. Ces paramètres présentés sous formes de publication, sont structurés de la manière suivante :

- Influence des caractéristiques physiques du support,
- Influence de la composition chimique respective du support et de la molécule active,
- Impact de la technique d'incorporation du principe actif dans le support.

La mise au point d'un tel système requiert également une évaluation *in vitro* de la libération de la molécule avant utilisation clinique. Contrairement au contrôle des formes pharmaceutiques, aucun essai de dissolution normalisé n'est décrit pour ces biomatériaux. Or, les résultats de ces essais sont très largement dépendants des conditions expérimentales. Le dernier paragraphe fait donc le point sur les différents dispositifs et les conditions opératoires décrits dans la littérature pour établir les cinétiques de dissolution *in vitro* de molécules thérapeutiques chargées sur des biocéramiques phosphocalciques.

I-6- Positionnement de l'étude

L'étude bibliographique a mis en évidence dans un premier temps, l'intérêt d'utiliser des matériaux synthétiques poreux en phosphate de calcium pour le comblement osseux. Leur composition chimique est proche de celle du minéral osseux et un réseau de pores favorise l'ostéoconduction et les échanges avec les fluides biologiques. Parallèlement, dans le cadre d'une application en tant que système de délivrance d'un principe actif (DDS), ce réseau poreux permet l'intégration d'une molécule à visée thérapeutique. Le couplage substitut osseux poreux ostéoconducteur et fonctionnalisation thérapeutique apparaît ainsi prometteur pour le traitement de pathologies osseuses.

De nombreux paramètres tels que les caractéristiques physico-chimiques du substitut osseux et de la molécule active, ainsi que les conditions de l'imprégnation, sont à prendre en considération pour la conception d'un *Drug Delivery System*. Les paramètres principaux susceptibles de déterminer les propriétés thérapeutiques d'un tel système (aptitude au chargement et à la délivrance du principe actif) sont récapitulés sur la Figure I-8. Ils peuvent être divisés en trois catégories : (1) les caractéristiques du support phosphocalciques, (2) la chimie du principe actif et (3) les conditions d'imprégnation. Par ailleurs, selon les compositions respectives du support et de la molécule active, des interactions physico-chimiques d'intensité variable se mettent en place, modulant également les caractéristiques du DDS.

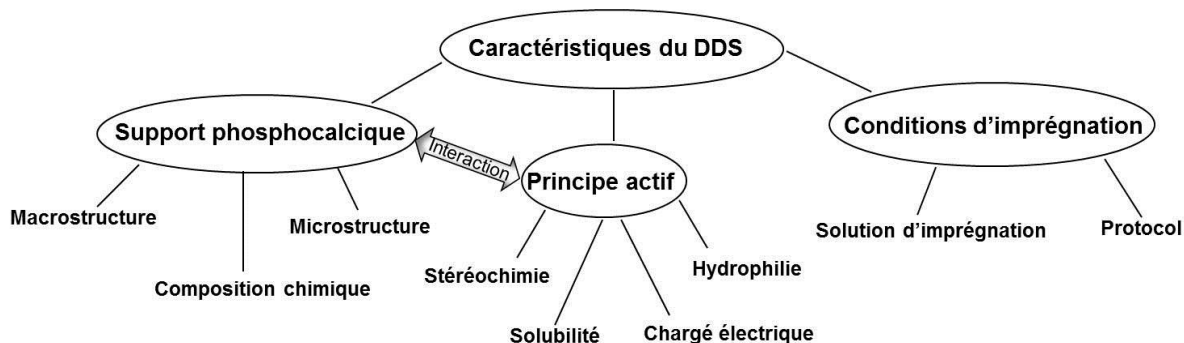


Figure I-8- Paramètres principaux contrôlant les caractéristiques d'un *Drug Delivery System*

Le travail présenté ici est consacré à l'étude d'un système combiné « sphéroïdes phosphocalciques poreux/ibuprofène ». Grâce à leur forme sphérique, ces substituts sont adaptés au comblement de cavités osseuses à géométrie complexe [Chevalier'10]. En effet, l'empilement des sphéroïdes dans la fraction granulométrique [710-1000] μm crée des porosités inter-granulaires de 180 μm de diamètre environ, optimales pour la reconstitution osseuse [Chevalier'08]. De plus, la microporosité générée par l'élimination du porogène et la calcination de ces sphéroïdes est favorable à la circulation des fluides biologiques ainsi qu'à l'incorporation de molécules actives. Le principe actif retenu pour cette étude est un agent anti-inflammatoire, l'ibuprofène, en raison de sa taille moléculaire (0,6-1 nm) [Higgins'01] adaptée à son inclusion dans des supports poreux. Par ailleurs, comme il a été vu dans le chapitre

bibliographique, l'administration locale d'anti-inflammatoire est intéressante pour le traitement de pathologies osseuses de type inflammatoire.

Un précédent travail a démontré la faisabilité du concept. Il s'agit ici d'étudier plus particulièrement les caractéristiques de ce système et d'identifier les paramètres déterminant ses qualités thérapeutiques (dose d'agent thérapeutique chargé et cinétique de libération *in vitro*).

Dans cet objectif, l'étude explore tout d'abord l'incidence de la composition chimique et des propriétés texturales du support, par la comparaison de sphéroïdes poreux d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate tricalcique beta (β -TCP). La deuxième partie est consacrée à l'analyse des conditions d'imprégnation : nature du solvant, température, agitation et protocole d'imprégnation. Enfin, le dernier chapitre approfondit la caractérisation des sphéroïdes chargés par des solutions d'ibuprofène de concentration croissante. Il expose les intérêts et les limites des différentes techniques de dosage des principes actifs dans les DDS.

Références

- [Afnor'08] - AFNOR ISO 13779-3 (2008). "Implants chirurgicaux - Hydroxyapatite Partie 3: Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase"
- [Al-Sokanee'09] - Al-Sokanee ZN, Toabi AAH, Al-Assadi MJ and Alassadi EAS. The drug release study of ceftriaxone from porous hydroxyapatite scaffolds. 2009. *AAPS PharmSciTech*;10:772-9
- [Annaz'04] - Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T and Di Silvio L. An ultrastructural study of cellular response to variation in porosity in phase-pure hydroxyapatite. 2004. *Journal of Microscopy*;216:97-109
- [Arkfeld'05] - Arkfeld DG and Rubenstein E. Quest for the Holy Grail to cure arthritis and osteoporosis: Emphasis on bone drug delivery systems. 2005. *Advanced Drug Delivery Reviews*;57:939-44
- [Arosarena'05] - Arosarena O. Tissue engineering. 2005. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery*;13:233-41
- [Athanasίου'00] - Athanasίου KA, Zhu CF, Lanctot DR, Agrawal CM and Wang X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. 2000. *Tissue Engineering*;6:361-81
- [Banerjee'11] - Banerjee SS, Roy M and Bose S. PH tunable fluorescent calcium phosphate nanocomposite for sensing and controlled drug delivery. 2011. *Advanced Engineering Materials*;13:B10-B7
- [Barrère'08] - Barrère F, Mahmood TA, de Groot K and van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. 2008. *Materials Science and Engineering R: Reports*;59:38-71
- [Barroug'02] - Barroug A and Glimcher MJ. Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: Adsorption and release of cisplatin in vitro. 2002. *Journal of Orthopaedic Research*;20:274-80
- [Barroug'04] - Barroug A, Kuhn LT, Gerstenfeld LC and Glimcher MJ. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: *In vitro* controlled adsorption and release. 2004. *Journal of Orthopaedic Research*;22:703-8
- [Barroug'92] - Barroug A, Lemaître J and Rouxhet PG. Influence of crystallite size on the surface properties of calcium-deficient hydroxyapatites. 1992. *Journal of Alloys and Compounds*;188:152-6
- [Benaziz'01] - Benaziz L, Barroug A, Legrouri A, Rey C and Lebugle A. Adsorption of O-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite. 2001. *Journal of Colloid and Interface Science*;238:48-53
- [Bernache-Assollant'03] - Bernache-Assollant D, Ababou A, Champion E and Heughebaert M. Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I. Calcination and particle growth. 2003. *Journal of the European Ceramic Society*;23:229-41
- [Betz'02] - Betz RR. Limitations of autograft and allograft: New synthetic solutions. 2002. *Orthopedics*;25:s561-s70
- [Bock'01] - Bock TK and Kraas U. Experience with the Diosna mini-granulator and assessment of process scalability. 2001. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*;52:297-303
- [Bohner'05] - Bohner M, Gbureck U and Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. 2005. *Biomaterials*;26:6423-9

- [Bose'11a] - Bose S, Tarafder S, Edgington J and Bandyopadhyay A. Calcium phosphate ceramics in drug delivery. 2011. *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*;63:93-8
- [Bose'11b] - Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. 2011. *Acta Biomaterialia*; article in press.
- [Bouler'96] - Bouler JM, Trécant M, Delécrin J, Royer J, Passuti N and Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of five synthesis parameters on compressive strength. 1996. *Journal of Biomedical Materials Research*;32:603-9
- [Boutin'72] - Boutin P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. 1972. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur.*;58:229-46
- [Boyce'99] - Boyce T, Edwards J and Scarborough N. Allograft bone: The influence of processing on safety and performance. 1999. *Orthopedic Clinics of North America*;30:571-81
- [Burg'00] - Burg KJL, Porter S and Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. 2000. *Biomaterials*;21:2347-59
- [Byrne'02] - Byrne RS and Deasy PB. Use of commercial porous ceramic particles for sustained drug delivery. 2002. *International Journal of Pharmaceutics*;246:61-73
- [Cabañas'09] - Cabañas MV, Peña J, Román J and Vallet-Regí- M. Tailoring vancomycin release from β -TCP/agarose scaffolds. 2009. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*;37:249-56
- [Campoccia] - Campoccia D, Montanaro L, Speziale P and Arciola CR. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*;31:6363-77
- [Carli'09] - Carli P, Landais C, Aletti M, Cournac JM, Poisnel E and Paris JF. Current treatment of rheumatoid arthritis. 2009. *Revue de Medicine*;30:1067-79
- [Cazalbou'04] - Cazalbou S, Eichert D, Drouet C, Combes C and Rey C. Biological mineralisations based on calcium phosphate. 2004. *Compte Rendu-Palevol*;3:563-72
- [Chai'07] - Chai F, Hornez JC, Blanchemain N, Neut C, Descamps M and Hildebrand HF. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. 2007. *Biomolecular Engineering*;24:510-4
- [Chen'05a] - Chen CH, Takita K, Honda S and Awaji H. Fracture behavior of cylindrical porous alumina with pore gradient. 2005a. *Journal of the European Ceramic Society*;25:385-91
- [Chen'05b] - Chen CH, Takita K, Ishiguro S, Honda S and Awaji H. Fabrication on porous alumina tube by centrifugal molding. 2005b. *Journal of the European Ceramic Society*;25:3257-64
- [Chevalier'08] - Chevalier E, Chulia D, Pouget C and Viana M. Fabrication of porous substrates: A review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. 2008. *Journal of Pharmaceutical Sciences*;97:1135-54
- [Chevalier'09a] - Chevalier E, Viana M, Artaud A, Chomette L, Haddouchi S, Devidts G and Chulia D. Comparison of three dissolution apparatuses for testing calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems. 2009a. *AAPS PharmSciTech*;10:597-605

- [Chevalier'09b] - Chevalier E, Viana M, Artaud A, Haddouchi S and Chulia D. A novel application of the T-cell for flow-through dissolution: The case of bioceramics used as ibuprofen carrier. 2009b. *Talanta*;77:1545-8
- [Chevalier'09c] - Chevalier E, Viana M, Cazalbou S and Chulia D. Comparison of low-shear and high-shear granulation processes: Effect on implantable calcium phosphate granule properties. 2009c. *Drug Development and Industrial Pharmacy*;35:1255-63
- [Chevalier] - Chevalier E, Viana M, Cazalbou S, Makein L, Dubois J and Chulia D. Ibuprofen-loaded calcium phosphate granules: Combination of innovative characterization methods to relate mechanical strength to drug location. *Acta Biomaterialia*;6:266-74
- [Chotard-Ghodsni'09] - Chotard-Ghodsni R, Lucas S, Pagnoux C, Champion E, Viana M, Chulia D, Anselme K, Chartier T. Elaboration of a well-ordered porous bioceramic via a heterocoagulation colloidal process. 2009. *Key engineering materials*;396-98:515-8
- [Christoffersen'86] - Christoffersen MR, Christoffersen J, Ibsen P and Ipsen H. Adsorption of ovalbumin on calcium hydroxyapatite crystals. 1986. *Colloids and Surfaces*;18:1-8
- [Ciccone 2nd'01] - Ciccone 2nd WJ, Motz C, Bentley C and Tasto JP. Bioabsorbable implants in orthopaedics: new developments and clinical applications. 2001. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*;9:280-8
- [Cosijns'07] - Cosijns A, Vervaet C, Luyten J, Mullens S, Siepmann F, Van Hoorebeke L, Masschaele B, Cnudde V and Remon JP. Porous hydroxyapatite tablets as carriers for low-dosed drugs. 2007. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*;67:498-506
- [Cummings'02] - Cummings SR and Melton Iii LJ. Osteoporosis I: Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. 2002. *Lancet*;359:1761-7
- [Cunin'00] - Cunin G, Boissonnet H, Petite H, Blanchat C and Guillemain G. Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material. 2000. *Spine*;25:1070-6
- [Dasgupta'09] - Dasgupta S, Bandyopadhyay A and Bose S. Reverse micelle-mediated synthesis of calcium phosphate nanocarriers for controlled release of bovine serum albumin. 2009. *Acta Biomaterialia*;5:3112-21
- [Dasgupta'10] - Dasgupta S, Banerjee SS, Bandyopadhyay A and Bose S. Zn- and Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein. 2010. *Langmuir*;26:4958-64
- [Dashti'10] - Dashti A, Ready D, Salih V, Knowles JC, Barralet JE, Wilson M, Donos N and Nazhat SN. In vitro antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss® bone graft. 2010. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*;93:394-400
- [De Groot'87] - De Groot K, Geesink R, Klein CPAT and Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. 1987. *Journal of Biomedical Materials Research*;21:1375-81
- [Descamps'08] - Descamps M, Duhoo T, Monchau F, Lu J, Hardouin P, Hornez JC and Leriche A. Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics. 2008. *Journal of the European Ceramic Society*;28:149-57
- [Descamps'09] - Descamps M, Hornez JC and Leriche A. Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications. 2009. *Journal of the European Ceramic Society*;29:369-75

- [Destainville'03a] - Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D and Laborde E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. 2003a. *Materials Chemistry and Physics*;80:269-77
- [Destainville'03b] – Destainville A, Rolo A, Champion E, Bernache-Assollant D, Synthesis and characterization of beta tricalcium phosphate. 2003. *Key Engineering Materials*;240-242:489-492
- [Destainville'06] – Etude du phosphate tricalcique. Application à l'élaboration de biomatériaux céramiques macroporeux en phosphate de calcium. 2006. Thèse, Limoges.
- [Deville'06] - Deville S, Saiz E and Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. 2006. *Biomaterials*;27:5480-9
- [Doblaré'04] - Doblaré M, García JM and Gomez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: A review. 2004. *Engineering Fracture Mechanics*;71:1809-40
- [Dorozhkin'07] - Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates. 2007. *Journal of Materials Science*;42:1061-95
- [Dorozhkin'10] - Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. 2010. *Biomaterials*;31:1465-85
- [Duschler'95] - Duschler G, Carius W and Bauer KH. Single-step granulation method with microwaves: Preliminary studies and pilot scale results. 1995. *Drug Development and Industrial Pharmacy*;21:1599-610
- [Elliott'94] - J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier Science, Amsterdam, 1994.
- [Eur'11] - *European Pharmacopoeia*. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2011
- [Fabbri'95] - Fabbri M, Celotti GC and Ravaglioli A. Hydroxyapatite-based porous aggregates: Physico-chemical nature, structure, texture and architecture. 1995. *Biomaterials*;16:225-8
- [Famery'94] - Famery R, Richard N and Boch P. Preparation of α - and β -tricalcium phosphate ceramics, with and without magnesium addition. 1994. *Ceramics International*;20:327-36
- [Faucheux'09] - Faucheux C, Verron E, Soueidan A, Josse S, Arshad MD, Janvier P, Pilet P, Bouler JM, Bujoli B and Guicheux J. Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption in vitro. 2009. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*;89:46-56
- [Faure'99] - Faure A, Grimsey IM, Rowe RC, York P and Cliff MJ. Applicability of a scale-up methodology for wet granulation processes in Collette Gral high shear mixer-granulators. 1999. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*;8:85-93
- [Fernandez-Carballido'04] - Fernandez-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT and Pastoriza P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro. 2004. *International Journal of Pharmaceutics*;279:33-41
- [Ferraz'07] - Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC and Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: Release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. 2007. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*;81:994-1004

- [Gabay'07] - Gabay O and Berenbaum F. Inflammation and joint diseases. 2007. *Inflammation et pathologies articulaires*;2007:37-42
- [Gautier'01] - Gautier H, Daculsi G and Merle C. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: In vitro characterization and microbiological activity. 2001. *Biomaterials*;22:2481-7
- [Gautier'98] - Gautier H, Guicheux J, Grimandi G, Faivre-Chauvet A, Daculsi G and Merle C. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. 1998. *Journal of Biomedical Materials Research*;40:606-13
- [Gautier'00] - Gautier H, Merle C, Auget JL and Daculsi G. Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: Comparison with a classical method. 2000. *Biomaterials*;21:243-9
- [Gbureck'08] - Gbureck U, Vorndran E and Barralet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. 2008. *Acta Biomaterialia*;4:1480-6
- [Gbureck'07] - Gbureck U, Vorndran E, Müller FA and Barralet JE. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. 2007. *Journal of Controlled Release*;122:173-80
- [Gelse'03] - Gelse K, Pöschl E and Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. 2003. *Advanced Drug Delivery Reviews*;55:1531-46
- [Ginebra'06] - Ginebra MP, Traykova T and Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. 2006. *Journal of Controlled Release*;113:102-10
- [Greenlee Jr'72] - Greenlee Jr TK, Beckham CA, Crebo AR and Malmorg JC. Glass Ceramic Bone Implants. 1972. *Journal of Biomedical Materials Research*;6:235-44
- [Guicheux'97] - Guicheux J, Grimandi G, Trecant M, Faivre A, Takahashi S and Daculsi G. Apatite as carrier for growth hormone: In vitro characterization of loading and release. 1997. *Journal of Biomedical Materials Research*;34:165-70
- [Habraken'07] - Habraken WJEM, Wolke JGC and Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. 2007. *Advanced Drug Delivery Reviews*;59:234-48
- [Hasegawa'04] - Hasegawa M, Sudo A, Komlev VS, Barinov SM and Uchida A. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. 2004. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*;70:332-9
- [Hausman'04] - Hausman DS. Comparison of Low Shear, High Shear, and Fluid Bed Granulation during Low Dose Tablet Process Development. 2004. *Drug Development and Industrial Pharmacy*;30:259-66
- [Hench'98] - Hench LL. Bioceramics. 1998. *Journal of the American Ceramic Society*;81:1705-27
- [Hench'84] - Hench LL and Wilson J. Surface-active biomaterials. 1984. *Science*;226:630-6
- [Herath'05] - Herath HMTU, Di Silvio L and Evans JRG. Porous hydroxyapatite ceramics for tissue engineering. 2005. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*;3:192-8

- [Hildebrand'06] - Hildebrand HF, Blanchemain N, Mayer G, Chai F, Lefebvre M and Boschin F. Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices. 2006. *Surface and Coatings Technology*;200:6318-24
- [Hlady'79] - Hlady V and Füredi-Milhofer H. Adsorption of human serum albumin on precipitated hydroxyapatite. 1979. *Journal of Colloid and Interface Science*;69:460-8
- [Huang'08] - Huang WC, Zheng H and Weng LL. Synthesis of tetracycline analogs and their bone affinities. 2008. *Chinese Chemical Letters*;19:19-22
- [Hulbert'93] - Hulbert SF. The use of alumina and zirconia in surgical implants. 1993. *An Introduction to Bioceramics*;25-40
- [Iafisco'09] - Iafisco M, Palazzo B, Marchetti M, Margiotta N, Ostuni R, Natile G, Morpurgo M, Gandin V, Marzano C and Roveri N. Smart delivery of antitumoral platinum complexes from biomimetic hydroxyapatite nanocrystals. 2009. *Journal of Materials Chemistry*;19:8385-92
- [Isobe'07] - Isobe T, Kameshima Y, Nakajima A and Okada K. Preparation and properties of porous alumina ceramics with uni-directionally oriented pores by extrusion method using a plastic substance as a pore former. 2007. *Journal of the European Ceramic Society*;27:61-6
- [Isobe'06a] - Isobe T, Kameshima Y, Nakajima A, Okada K and Hotta Y. Extrusion method using nylon 66 fibers for the preparation of porous alumina ceramics with oriented pores. 2006a. *Journal of the European Ceramic Society*;26:2213-7
- [Isobe'06b] - Isobe T, Tomita T, Kameshima Y, Nakajima A and Okada K. Preparation and properties of porous alumina ceramics with oriented cylindrical pores produced by an extrusion method. 2006b. *Journal of the European Ceramic Society*;26:957-60
- [Itokazu'99] - Itokazu M, Esaki M, Yamamoto K, Tanemori T and Kasai T. Local drug delivery system using ceramics: Vacuum method for impregnating a chemotherapeutic agent into a porous hydroxyapatite block. 1999. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;10:249-52
- [Itokazu'98a] - Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E and Katagiri Y. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. 1998a. *Journal of Biomedical Materials Research*;39:536-8
- [Itokazu'98b] - Itokazu M, Yang W, Aoki T, Ohara A and Kato N. Synthesis of antibiotic-loaded interporous hydroxyapatite blocks by vacuum method and in vitro drug release testing. 1998b. *Biomaterials*;19:817-9
- [Iveson'98] - Iveson SM and Litster JD. Liquid-bound granule impact deformation and coefficient of restitution. 1998. *Powder Technology*;99:234-42
- [Jain'00] - Jain AK and Panchagnula R. Skeletal drug delivery systems. 2000. *International Journal of Pharmaceutics*;206:1-12
- [Jarcho'81] - Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. 1981. *Clinical Orthopaedics and Related Research*;No.157:259-78
- [Jarcho'76] - Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobick J, Kay JF and Doremus RH. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. 1976. *Journal of Materials Science*;11:2027-35

- [Jiang'04] - Jiang D, Premachandra GS, Johnston C and Hem SL. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. 2004. *Vaccine*;23:693-8
- [Jones'03] - Jones JR and Hench LL. Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering. 2003. *Journal of Materials Science*;38:3783-90
- [Josse'05] - Josse S, Faucheux C, Soueidan A, Grimandi G, Massiot D, Alonso B, Janvier P, Laïb S, Pilet P, Gauthier O, Daculsi G, Guicheux J, Bujoli B and Bouler J-M. Novel biomaterials for bisphosphonate delivery. 2005. *Biomaterials*;26:2073-80
- [Kandori'98] - Kandori K, Fujiwara A, Mukai M, Yasukawa A and Ishikawa T. Evaluation of the adsorption affinity of proteins to calcium hydroxyapatites by desorption and pre-adsorption methods. 1998. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*;11:313-20
- [Kandori'97] - Kandori K, Horigami N, Kobayashi H, Yasukawa A and Ishikawa T. Adsorption of lysozyme onto various synthetic hydroxyapatites. 1997. *Journal of Colloid and Interface Science*;191:498-502
- [Kandori'99] - Kandori K, Mukai M, Fujiwara A, Yasukawa A and Ishikawa T. Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on hydrophobic calcium hydroxyapatites. 1999. *Journal of Colloid and Interface Science*;212:600-3
- [Kartsogiannis'04] - Kartsogiannis V and Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. 2004. *Molecular and Cellular Endocrinology*;228:79-102
- [Kawasaki'90] - Kawasaki T, Niikura M and Kobayashi Y. Fundamental study of hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. III. Direct experimental confirmation of the existence of two types of adsorbing surface on the hydroxyapatite crystal. 1990. *Journal of Chromatography*;515:125-48
- [Kay'64] - Kay MI, Young RA and Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. 1964. *Nature*;204:1050-2
- [Klein'85] - Klein CPAT, de Groot K, Drissen AA and van der Lubbe HBM. Interaction of biodegradable β -whitlockite ceramics with bone tissue: An in vivo study. 1985. *Biomaterials*;6:189-92
- [Knight'01] – Knight P.C. Structuring agglomerated products for improved performance. 2001. *Powder Technology*;119:14-25
- [Komlev'02] - Komlev VS and Barinov SM. Porous hydroxyapatite ceramics of bi-modal pore size distribution. 2002. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;13:295-9
- [Komlev'03] - Komlev VS, Barinov SM, Girardin E, Oscarsson S, Rosengren Å, Rustichelli F and Orlovskii VP. Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules: Processing and characterization. 2003. *Science and Technology of Advanced Materials*;4:503-8
- [Krajewski'00] - Krajewski A, Ravaglioli A, Roncari E, Pinasco P and Montanari L. Porous ceramic bodies for drug delivery. 2000. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;11:763-71
- [Kundu'10a] - Kundu B, Lemos A, Soundrapandian C, Sen PS, Datta S, Ferreira JMF and Basu D. Development of porous HAp and β -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system. 2010. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;21:1-15

- [Kundu'10b] - Kundu B, Soundrapandian C, Nandi SK, Mukherjee P, Dandapat N, Roy S, Datta BK, Mandal TK, Basu D and Bhattacharya RN. Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: A systematic approach for *in vitro* and *in vivo* animal trial. 2010. *Pharmaceutical Research*;27:1659-76
- [Lacerda'09] - Lacerda KA, Lameiras FS and Silva VV. Iodine measurement in porous matrices based on calcium phosphate compounds. 2009. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*;280:469-73
- [Lebugle'02] - Lebugle A, Rodrigues A, Bonneville P, Voigt JJ, Canal P and Rodriguez F. Study of implantable calcium phosphate systems for the slow release of methotrexate. 2002. *Biomaterials*;23:3517-22
- [Lee'03] - Lee JS and Park JK. Processing of porous ceramic spheres by pseudo-double-emulsion method. 2003. *Ceramics International*;29:271-8
- [LeGeros'08] - LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. 2008. *Chemical Reviews*;108:4742-53
- [LeGeros'02] - LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. 2002. *Clinical Orthopaedics and Related Research*;81-98
- [LeGeros'91] - LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. 1991. *Monographs in oral science*;15:1-201
- [Legros'84] - Legros R., Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés. 1984. Thèse I.N.P., Toulouse.
- [Leprêtre'09] - Leprêtre S, Chai F, Hornez JC, Vermet G, Neut C, Descamps M, Hildebrand HF and Martel B. Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. 2009. *Biomaterials*;30:6086-93
- [Lerk'74] - Lerk ICF, Bolhuis GK and De Boer AH. Comparative evaluation of excipients for direct compression. II. 1974. *Pharmaceutisch Weekblad*;109:945-55
- [Lim'09] - Lim H, Kassim A, Huang N, Khiewc P and Chiu W. Three-dimensional flower-like brushite crystals prepared from high internal phase emulsion for drug delivery application. 2009. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*;345:211-8
- [Lin'96] - Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. 1996. *Bone*;18:75-85
- [Liou'03] - Liou SC, Chen SY and Liu DM. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. 2003. *Biomaterials*;24:3981-8
- [Liu'01] - Liu DM, Troczynski T and Tseng WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: Process development. 2001. *Biomaterials*;22:1721-30
- [Liu'03] - Liu J, Ye X, Wang H, Zhu M, Wang B and Yan H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. 2003. *Ceramics International*;29:629-33
- [Liu'05] - Liu T-Y, Chen S-Y, Liu D-M and Liou S-C. On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery. 2005. *Journal of Controlled Release*;107:112-21

- [Lyckfeldt'98] - Lyckfeldt O and Ferreira JMF. Processing of Porous Ceramics by 'Starch Consolidation'. 1998. Journal of the European Ceramic Society;18:131-40
- [Ma'08] - Ma B, Clarke SA, Brooks RA and Rushton N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. 2008. Acta Biomaterialia;4:149-55
- [Makarov'10] - Makarov C, Gotman I, Radin S, Ducheyne P and Gutmanas EY. Vancomycin release from bioresorbable calcium phosphate-polymer composites with high ceramic volume fractions. 2010. Journal of Materials Science;45:6320-4
- [Mastrogiacomo'06] - Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R and Quarto R. Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. 2006. Biomaterials;27:3230-7
- [Matsumoto'04] - Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Yamaguchi S, Kusunose T, Toyonaga T, Hamada Y and Takahashi J. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. 2004. Biomaterials;25:3807-12
- [Melville'08] - Melville AJ, Rodríguez-Lorenzo LM and Forsythe JS. Effects of calcination temperature on the drug delivery behaviour of Ibuprofen from hydroxyapatite powders. 2008. Journal of Materials Science: Materials in Medicine;19:1187-95
- [Mouriño'10] - Mouriño V and Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. 2010. Journal of the Royal Society Interface;7:209-27
- [Murugan'04] - Murugan R and Ramakrishna S. Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. 2004. Biomaterials;25:3073-80
- [Naiya'09] - Naiya TK, Bhattacharya AK, Mandal S and Das SK. The sorption of lead(II) ions on rice husk ash. 2009. Journal of Hazardous Materials;163:1254-64
- [Nakashima'06] - Nakashima K and Yamauchi J. Magnetic properties of gadolinium-doped I^2 -tricalcium phosphate. 2006. Journal of Alloys and Compounds;408-412:761-5
- [Nancollas'06] - Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG and Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. 2006. Bone;38:617-27
- [Nandi'09] - Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, Mandal TK, Datta S, De DK and Basu D. Cefuroxime-impregnated calcium phosphates as an implantable delivery system in experimental osteomyelitis. 2009. Ceramics International;35:1367-76
- [Narasaraju'96] - Narasaraju TSB and Phebe DE. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. 1996. Journal of Materials Science;31:1-21
- [Netz'01] - Netz DJA, Sepulveda P, Pandolfelli VC, Spadaro ACC, Alencastre JB, Bentley MVLB and Marchetti JM. Potential use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system. 2001. International Journal of Pharmaceutics;213:117-25
- [Palazzo'07] - Palazzo B, Iafisco M, Laforgia M, Margiotta N, Natile G, Bianchi CL, Walsh D, Mann S and Roveri N. Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties. 2007. Advanced Functional Materials;17:2180-8

- [Palazzo'05] - Palazzo B, Sidoti MC, Roveri N, Tampieri A, Sandri M, Bertolazzi L, Galbusera F, Dubini G, Vena P and Contro R. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach. 2005. *Materials Science and Engineering C*;25:207-13
- [Paul'95] - Paul W and Sharma CP. Antibiotic loaded hydroxyapatite osteoconductive implant material - in vitro release studies. 1995. *Journal of Materials Science Letters*;14:1792-4
- [Perrin'65] - Perrin DD. Binding of tetracyclines to bone [17]. 1965. *Nature*;208:787-8
- [Petroni'08] - Petrone C, Hall G, Langman M and Filiaggi MJ. Compaction strategies for modifying the drug delivery capabilities of gelled calcium polyphosphate matrices. 2008. *Acta Biomaterialia*;4:403-13
- [Pham'02] - Pham HH, Luo P, Génin F and Dash AK. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery systems by precipitation and spray drying technique. 2002. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*;3
- [Porter'09] - Porter JR, Ruckh TT and Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. 2009. *Biotechnology Progress*;25:1539-60
- [Prabhakaran'07] - Prabhakaran K, Melkeri A, Gokhale NM and Sharma SC. Preparation of macroporous alumina ceramics using wheat particles as gelling and pore forming agent. 2007. *Ceramics International*;33:77-81
- [Prado Da Silva'02] - Prado Da Silva MH, Lemos AF, Gibson IR, Ferreira JMF and Santos JD. Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives. 2002. *Journal of Non-Crystalline Solids*;304:286-92
- [Queiroz'05] - Queiroz AC, Santos JD and Monteiro FJ. Development of a system to adsorb drugs onto calcium phosphate materials. 2005. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;16:641-6
- [Queiroz'01] - Queiroz AC, Santos JD, Monteiro FJ, Gibson IR and Knowles JC. Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. 2001. *Biomaterials*;22:1393-400
- [Rahmanian'09] - Rahmanian N, Ghadiri M, Jia X and Stepanek F. Characterisation of granule structure and strength made in a high shear granulator. 2009. *Powder Technology*;192:184-94
- [Raynaud'02] - Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D and Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. 2002. *Biomaterials*;23:1065-72
- [Rees'01] - Rees SG, Hughes Wassell DT, Waddington RJ and Embery G. Interaction of bone proteoglycans and proteoglycan components with hydroxyapatite. 2001. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*;1568:118-28
- [Reves'09] - Reves BT, Bumgardner JD, Cole JA, Yang Y and Haggard WO. Lyophilization to improve drug delivery for chitosan-calcium phosphate bone scaffold construct: a preliminary investigation. 2009. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*;90:1-10
- [Rouahi'06] - Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A and Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: Influence on *in vitro* biocompatibility of ceramics after sintering. 2006. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*;47:10-9

- [Roussi re'08] - Roussi re H, Fayon F, Alonso B, Rouillon T, Schnitzler V, Verron E, Guicheux J, Petit M, Massiot D, Janvier P, Boul r JM and Bujoli B. Reaction of zoledronate with β -tricalcium phosphate for the design of potential drug device combined systems. 2008. *Chemistry of Materials*;20:182-91
- [Salinas'07] - Salinas AJ and Vallet-Regi  M. Evolution of ceramics with medical applications. 2007. *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie*;633:1762-73
- [Santos'09a] - Santos C, Martins MA, Franke RP, Almeida MM and Costa MEV. Calcium phosphate granules for use as a 5-Fluorouracil delivery system. 2009a. *Ceramics International*;35:1587-94
- [Santos'09b] - Santos C, Rovath CF, Franke RP, Almeida MM and Costa MEV. Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system. 2009b. *Ceramics International*;35:509-13
- [Sepulveda'99] - Sepulveda P and Binner JGP. Processing of cellular ceramics by foaming and *in situ* polymerisation of organic monomers. 1999. *Journal of the European Ceramic Society*;19:2059-66
- [Seshima'06] - Seshima H, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Inoue T and Oda Y. Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules. 2006. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*;78:215-21
- [Shea'05] - Shea JE and Miller SC. Skeletal function and structure: Implications for tissue-targeted therapeutics. 2005. *Advanced Drug Delivery Reviews*;57:945-57
- [Shi'05] - Shi HT, Gong T, Liu SW, Chen S and Zhang ZR. Adsorption and desorption of insulin on porous hydroxyapatite microspheres. 2005. *Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi/Journal of the Ceramic Society of Japan*;113:579-83
- [Shimabayashi'91] - Shimabayashi S, Tanizawa Y and Ishida K. Effect of phosphorylated organic compound on the adsorption of bovine serum albumin by hydroxyapatite. 1991. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*;39:2183-8
- [Silva'03a] - Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MAR, Goes JC and Sombra ASB. Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. 2003a. *Solid State Sciences*;5:553-8
- [Silva'03b] - Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MAR, Go es JC and Sombra ASB. Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. 2003b. *Solid State Sciences*;5:553-8
- [Sivakumar'02] - Sivakumar M, Manjubala I and Panduranga Rao K. Preparation, characterization and in-vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-chitosan composite microspheres. 2002. *Carbohydrate Polymers*;49:281-8
- [Slosarczyk'00] - Slosarczyk A, Szymura-Oleksiak J and Mycek B. The kinetics of pentoxifylline release from drug-loaded hydroxyapatite implants. 2000. *Biomaterials*;21:1215-21
- [St hli'10] - St hli C, Bohner M, Bashoor-Zadeh M, Doebelin N and Baroud G. Aqueous impregnation of porous β -tricalcium phosphate scaffolds. 2010. *Acta Biomaterialia*;6:2760-72
- [Stahl'00] - Stahl H. Single-pot systems for drying pharmaceutical granules. 2000. *Pharmaceutical Technology Europe*;12:23-4+6
- [Stigter'04] - Stigter M, Bezemer J, De Groot K and Layrolle P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. 2004. *Journal of Controlled Release*;99:127-37

- [Studart'06] - Studart AR, Gonzenbach UT, Tervoort E and Gauckler LJ. Processing routes to macroporous ceramics: A review. 2006. *Journal of the American Ceramic Society*;89:1771-89
- [Szpalski'02] - Szpalski M and Gunzburg R. Applications of calcium phosphate - Based cancellous bone void fillers in trauma surgery. 2002. *Orthopedics*;25:s601-s9
- [Szymura-Oleksiak'01] - Szymura-Oleksiak J, Slosarczyk A, Cios A, Mycek B, Paszkiewicz Z, Szklarczyk S and Stankiewicz D. The kinetics of pentoxifylline release in vivo from drug-loaded hydroxyapatite implants. 2001. *Ceramics International*;27:767-72
- [Tanaka'89] - Tanaka H, Miyajima K, Nakagaki M and Shimabayashi S. Interactions of aspartic acid, alanine and lysine with hydroxyapatite. 1989. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*;37:2897-901
- [Tancret'06] - Tancret F, Bouler JM, Chamousset J and Minois LM. Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. 2006. *Journal of the European Ceramic Society*;26:3647-56
- [Teitelbaum'00] - Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. 2000. *Science*;289:1504-8
- [Teller'07] - Teller M, Gopp O, Neumann HG and Kühn KD. Release of gentamicin from bone regenerative materials: An in vitro study. 2007. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*;81:23-9
- [Thomazeau'97] - Thomazeau H and Langlais F. Antibiotic release by osseous implantation of tricalcium phosphate. *In vitro* and *in vivo* evaluation of different galenic devices. 1997. *Pharmacocinetique in vitro et in vivo de formes galeniques differentes*;121:663-6
- [Tomoda'10] - Tomoda K, Ariizumi H, Nakaji T and Makino K. Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins. 2010. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*;76:226-35
- [Trombe'72] - Trombe J. C. Contribution à l'étude de la décomposition et de la réactivité de certaines apatites hydroxylées, carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses. 1972. Thèse U.P.S., Toulouse.
- [Uchida'84] - Uchida A, Nade SML, McCartney ER and Ching W. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. 1984. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*;66:269-75
- [Vallet-Regí-'06] - Vallet-Regí- M. Revisiting ceramics for medical applications. 2006. *Dalton Transactions*;5211-20
- [Verron'10] - Verron E, Gauthier O, Janvier P, Le Guen H, Holopherne D, Cavagna R and Bouler JM. Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. 2010. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*;94:89-96
- [Wang'05a] - Wang C, Kasuga T and Nogami M. Macroporous calcium phosphate glass-ceramic prepared by two-step pressing technique and using sucrose as a pore former. 2005a. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;16:739-44
- [Wang'08] - Wang D. Targeted delivery for musculoskeletal diseases. 2008. *Pharmaceutical Research*;25:2878-80
- [Wang'05b] - Wang D, Miller SC, Kopeckova P and Kopecek J. Bone-targeting macromolecular therapeutics. 2005b. *Advanced Drug Delivery Reviews*;57:1049-76

- [Wang'09] - Wang Y, Hassan MS, Gunawan P, Lau R, Wang X and Xu R. Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure. 2009. *Journal of Colloid and Interface Science*;339:69-77
- [Washburn'21] - Washburn EW. The dynamics of capillary flow. 1921. *Physical Review*;17:273-83
- [Woodfield'02] - Woodfield TBF, Bezemer JM, Pieper JS, Van Blitterswijk CA and Riesle J. Scaffolds for tissue engineering of cartilage. 2002. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*;12:209-36
- [Wu'06] - Wu P and Grainger DW. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. 2006. *Biomaterials*;27:2450-67
- [Xiao'09] - Xiao J, Zhu Y, Liu Y, Zeng Y and Xu F. An asymmetric coating composed of gelatin and hydroxyapatite for the delivery of water insoluble drug. 2009. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*;20:889-96
- [Yang'08] - Yang P, Quan Z, Li C, Kang X, Lian H and Lin J. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. 2008. *Biomaterials*;29:4341-7
- [Yashima'03a] - Yashima M and Sakai A. High-temperature neutron powder diffraction study of the structural phase transition between α and α' phases in tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. 2003a. *Chemical Physics Letters*;372:779-83
- [Yashima'03b] - Yashima M, Sakai A, Kamiyama T and Hoshikawa A. Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction. 2003b. *Journal of Solid State Chemistry*;175:272-7
- [Ye'10] - Ye F, Guo H, Zhang H and He X. Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system. 2010 *Acta Biomaterialia*;6:2212-8
- [Yin'03] - Yin A, Margolis HC, Grogan J, Yao Y, Troxler RF and Oppenheim FG. Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. 2003. *Archives of Oral Biology*;48:361-8
- [Yu'10] - Yu T, Ye J, Gao C, Yu L and Wang Y. Synthesis and drug delivery property of calcium phosphate cement with special crystal morphology. 2010. *Journal of the American Ceramic Society*;93:1241-4
- [Zafirau'96] - Zafirau W, Billotte W, Parker D and Bajpai PK. Development of a ceramic device for the continuous local delivery of steroids. 1996. *Biomedical Sciences Instrumentation*;32:63-70
- [Zeller'06] - Zeller V and Desplaces N. Antibiotherapy of bone and joint infections. 2006. *Revue du Rhumatisme (Edition Français)*;73:183-90
- [Zeng'07] - Zeng T, Dong X, Chen S and Yang H. Processing and piezoelectric properties of porous PZT ceramics. 2007. *Ceramics International*;33:395-9
- [Zhang'07] - Zhang HL, Li JF and Zhang BP. Microstructure and electrical properties of porous PZT ceramics derived from different pore-forming agents. 2007. *Acta Materialia*;55:171-81
- [Zilberman'08] - Zilberman M and Elsner JJ. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. 2008. *Journal of Controlled Release*;130:202-15

Chapitre II

Développement du système combiné : Sphéroïdes phosphocalciques poreux/ibuprofène

Ce chapitre est destiné à étudier l'influence des paramètres liés aux supports phosphocalciques poreux sur les propriétés du DDS « sphéroïdes phosphocalciques poreux /ibuprofène ». Il est divisé en trois parties :

Dans un premier temps, le mécanisme d'adsorption de l'ibuprofène sur les surfaces internes et externes des sphéroïdes de β -TCP, ainsi que les interactions entre le principe actif et les granules sont étudiés. Les résultats sont présentés et discutés dans l'article « *β -TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system: Ibuprofen/carrier physicochemical interactions* ».

Puis, l'influence de la composition chimique des sphéroïdes sur les mécanismes d'interaction entre l'ibuprofène et les sphéroïdes poreux est analysée. Pour cela, deux phosphates de calcium, l'hydroxyapatite (HA) et le phosphate tricalcique beta (β -TCP), ont été choisies pour la fabrication des granules. Cette étude est présentée et argumentée dans l'article « *Porous calcium phosphate pellets as drug delivery systems: Effect of drug carrier composition on drug loading and in vitro release* ».

Enfin l'incidence des propriétés physiques des sphéroïdes phosphocalciques telles que la porosité, la surface spécifique et la taille, sur l'adsorption et le relargage du principe actif est évaluée. Les propriétés physiques des sphéroïdes ont été modulées par la température T_2 du traitement thermique. Pour cela, la fraction granulométrique [250-355] μm a été calcinée dans une gamme de la température allant de 800°C à 1000°C. Les propriétés d'adsorption et de dissolution de l'ibuprofène à partir des sphéroïdes dans cette fraction ont été comparées avec celles de la fraction [710-1000] μm . Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans l'article « *Effect of physical parameters of calcium phosphate porous pellets on ibuprofen loading and delivery properties* ».

Avant la présentation de ces publications, la démarche expérimentale adoptée pour cette étude est exposée en partie II-1.

II-1- Démarche expérimentale

Les principales étapes de la préparation des sphéroïdes poreux chargés en ibuprofène ainsi que leur caractérisation et leur évaluation en tant que « Drug Delivery System » sont présentées sur la figure II-1.

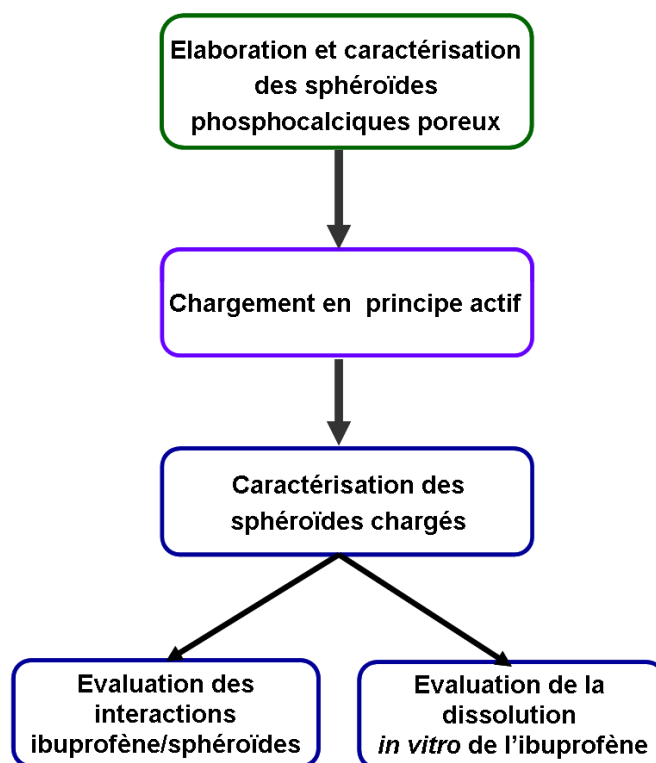


Figure II-1- Grandes étapes de l'élaboration et de l'évaluation du « Drug Delivery System » sphéroïdes phosphocalciques/ibuprofène.

II.1.1. Elaboration et caractérisation des sphéroïdes phosphocalciques poreux

Deux phosphates de calcium, l'hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), bioactive et très peu biorésorbable, et le phosphate tricalcique *beta* (β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), bioactif et biorésorbable, ont été choisis pour la fabrication des sphéroïdes poreux. L'hydroxyapatite phosphocalcique a été synthétisée au laboratoire par voie hydrothermale [Raynaud'02b] (Annexe 1). Le phosphate tricalcique utilisé est une poudre commerciale, fournie par la société Cooper (Annexe 2). Les sphéroïdes ont été fabriqués par granulation humide à haut cisaillement [Chevalier'08] dans un mélangeur-granulateur Mi-Pro (Pro-C-epT). Le protocole suivant est appliqué pour un lot de 200 g, composé de 90% en masse de poudre phosphocalcique et 10% en masse d'amidon pré-gélatinisé (Sepistab ST 200, Seppic), utilisé comme liant de granulation et agent porogène :

- 1) mélange à sec pendant 180 s avec une vitesse de pale et d'émoteur de 500 rpm ;

- 2) granulation avec une vitesse de pôle et d'émoteur de 1000 rpm et un débit de liquide de mouillage, l'eau distillée, de $35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- 3) sphéronisation pendant 60 s à une vitesse de pôle et d'émoteur de 500 rpm.

Les sphéroïdes obtenus ont été séchés en lit fluidisé (Glatt) pendant 20 minutes à 60°C , puis calibrés afin de retenir les fractions granulométriques $710\text{-}1000 \mu\text{m}$ et $250\text{-}355 \mu\text{m}$.

Remarque : les caractéristiques physiques des grains dépendent non seulement des paramètres du procédé de granulation (mélange, granulation, mouillage et sphéronisation), mais aussi des propriétés physicochimiques des matières premières (liant et poudre à granuler) [Litster'01-Rowe'89]. Dans ce travail, l'objectif n'était pas d'optimiser la granulation de l'hydroxyapatite. C'est pourquoi, faute de temps et de quantité de poudre d'HA disponible, les conditions de granulation du β -TCP optimisées dans des travaux précédents [Chevalier'08] ont été reprises, seule la quantité de liquide de mouillage a été adaptée. De ce fait, le rendement de granulation n'a pas été aussi élevé que pour le TCP et la quantité de sphéroïdes disponibles dans la fraction $[710\text{-}1000] \mu\text{m}$ était plus réduite.

Un traitement thermique a permis l'élimination du liant et l'amélioration des propriétés mécaniques des sphéroïdes par la consolidation (Figure II-2). Le traitement thermique est divisé en deux phases : le premier plateau à 270°C (T_1) correspond à la température de décomposition de l'amidon et le deuxième plateau (T_2) correspond, lui, à la température de consolidation des sphéroïdes. Dans le cas du phosphate tricalcique, la température T_2 a été fixée à 900°C pour deux raisons. La poudre commerciale utilisée pour l'élaboration des sphéroïdes de β -TCP est un mélange composé de monétite et d'hydroxyapatite (Annexe 2). Le traitement thermique des granules à 900°C conduit par réaction solide/solide entre les phases initiales, à la formation de la phase β -TCP. De plus, un traitement thermique à cette température améliore des propriétés mécaniques des sphéroïdes, en effet le frittage de la phase β -TCP commence à 700°C [Raynaud'02a - Chevalier'09].

Dans le cas de l'hydroxyapatite, T_2 a été fixée à 950°C . Pour pouvoir comparer les capacités d'adsorption des deux types de sphéroïdes, la température de calcination des granules d'HA a été ajustée afin d'obtenir une surface spécifique ($S_{\text{sp}} - \text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) proche de celle des sphéroïdes de β -TCP ($5,4 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). L'analyse préliminaire de la gamme de température $800\text{-}1000^\circ\text{C}$ a permis de retenir la température de 950°C pour la calcination des grains d'HA, en conduisant à une surface spécifique de $6,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$. La calcination de la poudre à cette température conduit également à une consolidation des sphéroïdes par frittage de l'HA qui commence à partir de 780°C [Raynaud'02a].

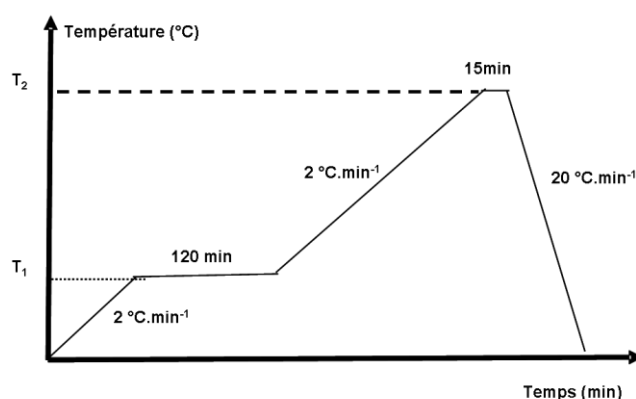


Figure II-2- Protocole de traitement thermique des sphéroïdes phosphocalciques.

$$T_1 = 270^{\circ}\text{C}, T_{2(\beta\text{-TCP})} = 900^{\circ}\text{C}, T_{2(\text{HA})} = 950^{\circ}\text{C}$$

Les sphéroïdes poreux ont ensuite fait l'objet de caractérisations physico-chimiques par diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), spectroscopie de diffusion Raman et microscopie électronique à balayage muni d'un canon à émission de champ (MEB-FEG pour *Field Emission Gun*). Les surfaces spécifiques ont été déterminées par adsorption d'azote suivant la méthode BET [Emmett'37] et la porosité a été mesurée à l'aide d'une porosimètre à intrusion de mercure. Les différentes caractéristiques physico-chimiques des sphéroïdes dans la fraction granulométrique [710-1000] μm sont récapitulées dans le tableau II-1.

Composition chimique	Traitement thermique	Ca/P	Porosité (%)	Taille des pores (nm)	S_{sp} ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$)
β -TCP	900°C 15 min	1,512	57	[80-300] [300-2000]	5,4
HA	950°C 15 min	1,662	67	[70-400] [400-6000]	6,3

Tableau II-1- Caractéristiques physico-chimiques des sphéroïdes phosphocalciques après calcination

II.1.2. Fonctionnalisation thérapeutique des sphéroïdes phosphocalciques

Méthode et paramètres du chargement en principe actif

Les sphéroïdes poreux ont été fonctionnalisés par adsorption d'une molécule anti-inflammatoire modèle, l'ibuprofène (ibuprofène 50 – BASF). Pour ce chargement, 350 mg de sphéroïdes de phosphate de calcium calcinés et calibrés sont immergés dans 4 mL d'une solution éthanolique d'ibuprofène à température ambiante et sans agitation. Après un temps de contact préalablement déterminé, les sphéroïdes chargés sont séparés du surnageant et séchés à température ambiante pendant 24h. Afin d'étudier les propriétés d'adsorption des sphéroïdes poreux, trois études ont été menées (tableau II-2).

Etude Paramètres	Cinétique d'adsorption	Isotherme d'adsorption	Isotherme de désorption
Paramètres variables	10 min < t < 1440 min	$C_{ibu} = 25, 50, 100, 150,$ 200 mg.mL^{-1}	$C_{ibu} = 300, 150,$ $100, 50 \text{ mg.mL}^{-1}$
Paramètres constants	$C_{ibu} = 100 \text{ mg.mL}^{-1}$	Temps de contact = 1 h	Temps de contact= 1 h

Tableau II-2- Paramètres expérimentaux utilisés lors de la fonctionnalisation

Les cinétiques d'adsorption ont été réalisées à concentration constante en ibuprofène mais pour un temps de contact variable. Elles ont permis de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de l'adsorption (eq.II-1)



Les isothermes d'adsorption ont été réalisées à temps de contact constant et pour une gamme de concentrations allant de 25 à 200 mg.mL⁻¹. Ces courbes ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes. Ces isothermes d'adsorption ont ensuite été modélisées par le modèle de Freundlich, décrit par l'équation II-2 (eq.II-2) :

$$Q = a \times C_e^m \quad (\text{eq.II-2})$$

où Q représente la quantité d'ibuprofène adsorbé (mmol.m⁻²), C_e la concentration à l'équilibre (eq.II-1) des solutions d'ibuprofène, a la capacité d'adsorption et m l'affinité d'adsorption.

Afin de vérifier la réversibilité de l'adsorption de l'ibuprofène par les sphéroïdes poreux, des isothermes de désorption ont été effectués. Les sphéroïdes ont tout d'abord été immergés dans une solution concentrée en ibuprofène (300 mg.mL⁻¹) pendant un temps de contact équivalent au temps d'équilibre d'adsorption. Les solutions d'imprégnation ont ensuite été diluées au 1/2, 1/3 et 1/6 par ajout d'éthanol, puis la quantité d'ibuprofène présente dans les sphéroïdes a été dosée.

Quantification de l'ibuprofène adsorbé

En raison de la solubilité très élevée de l'ibuprofène dans l'éthanol [Gracin'02], la quantité d'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes est déterminée après désorption complète de l'ibuprofène. Pour ce faire, les grains sont immergés dans 40 mL d'éthanol pendant 4 heures. La concentration en ibuprofène dans cette solution, dite solution d'extraction, est mesurée par spectrophotométrie UV-visible à $\lambda = 264\text{nm}$ et le taux de chargement des grains (*Drug Content* – DC%) est calculé à l'aide de l'équation II-3 (eq.II-3):

$$\text{DC\%} = \frac{\text{Masse d'ibuprofène adsorbé (mg)}}{\text{Masse de sphéroïdes chargés (mg)}} \times 100 \quad (\text{eq.II-3})$$

La fiabilité de la méthode de dosage a été contrôlée par deux tests. Premièrement, après la désorption de l'ibuprofène, les sphéroïdes séchés ont été immergés dans 40 mL d'éthanol pendant 6 heures puis séparés de leur surnageant. Afin de déterminer la quantité d'ibuprofène présente dans les surnageants, ceux-ci ont été dosés par spectrophotométrie UV. Deuxièmement, les sphéroïdes ont été caractérisés par spectroscopie FT-IR. Aucune trace d'ibuprofène n'ayant été détectée dans les surnageants ou observée sur les spectres FT-IR grains après désorption, il a été considéré que tout l'ibuprofène se trouvait dans les solutions d'extraction.

Effet du procédé d'imprégnation sur les sphéroïdes phosphocalciques

L'incidence de l'imprégnation par les solutions d'ibuprofène sur la composition et la structure des grains phosphocalciques a été étudiée. La cristallinité et la structure des sphéroïdes après contact avec les solutions d'ibuprofène ont été vérifiées par diffraction des rayons X et les diffractogrammes ont été comparés avec ceux effectués avant le chargement en principe actif. Cette étude a été complétée par une comparaison avant/après chargement par spectroscopie FT-IR. Parallèlement, la dissolution potentielle des grains dans les solutions d'ibuprofène a été étudiée en mesurant la concentration en ions calcium dans les solutions après l'imprégnation par colorimétrie suivant la méthode de l'orthocrésolphthaléine-complexone(o-CPC) à $\lambda=575$ nm. Les ions calcium donnent un complexe rouge lorsqu'ils réagissent avec ce composé (réaction II-1 et figure II-3) [Moorehead'74].

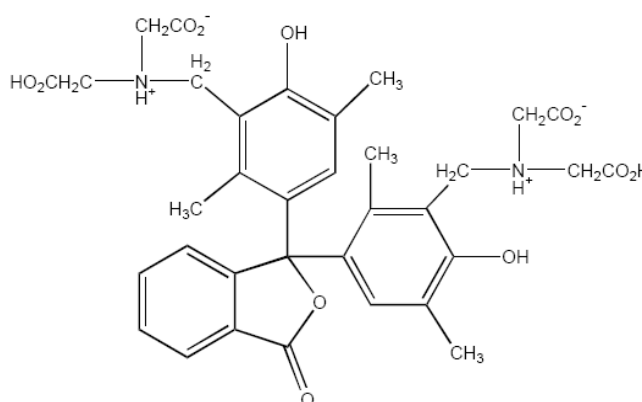


Figure II-3- Ortho-crésolphthaléine-complexone

L'ensemble des résultats a montré que le protocole d'imprégnation ne modifiait ni ne dégradait les sphéroïdes phosphocalciques. Les groupements et la structure cristalline des grains d'HA et de β -TCP restent inchangés après 1 heure d'immersion. La concentration maximale en ion Ca^{2+} mesurée est égale à $5 \times 10^{-4} \text{ mmol.mL}^{-1}$, ce qui indique que les sphéroïdes d'HA et de β -TCP sont très peu solubles dans les solutions d'imprégnation. Donc, la méthode d'incorporation de l'ibuprofène est adaptée et ne modifie pas les caractéristiques physicochimiques des sphéroïdes.

II.1.3. Caractérisation des sphéroïdes chargés

Les sphéroïdes chargés en ibuprofène ont été caractérisés afin de déterminer les interactions entre le principe actif et les supports poreux. Les cinétiques de dissolution *in vitro* de l'ibuprofène à partir des sphéroïdes ont également été établies.

Etude des interactions sphéroïdes phosphocalciques/ibuprofène

Pour étudier les d'interactions entre l'ibuprofène et les grains de β -TCP ou d'HA, les sphéroïdes chargés en ibuprofène ont fait l'objet de différentes caractérisations physico-chimiques. Tout d'abord la possible formation de nouvelles liaisons entre la molécule active et les supports phosphocalciques a été étudiée par spectroscopies Raman et FT-IR. Les spectres des sphéroïdes chargés ont été comparés avec ceux de l'ibuprofène et des sphéroïdes avant chargement. Les sphéroïdes chargés ont également été caractérisés par DRX, afin de vérifier la structure de l'ibuprofène adsorbé et par MEB-FEG pour déterminer sa morphologie à la surface des sphéroïdes. De plus la charge électrostatique des sphéroïdes a été déterminée par des mesures de potentiel zéta dans l'éthanol et dans des solutions éthanoliques d'ibuprofène de concentrations croissantes. Finalement, afin d'évaluer les modifications des propriétés physiques des sphéroïdes après chargement, leur surface spécifique (S_{sp}) et leur porosité ont été comparées à celles mesurées avant chargement.

Etude de la dissolution in vitro de l'ibuprofène

Afin d'étudier l'aptitude des sphéroïdes phosphocalciques chargés à la libération de la molécule active, des essais de dissolution *in vitro* ont été effectués. Les tests ont été conduits sur 275 mg de sphéroïdes chargés avec des solutions d'ibuprofène de concentration 200 mg.mL^{-1} et effectués dans un appareil à flux continu [European pharmacopeia'11] en utilisant un tampon phosphate ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$, pH= 7,5) comme milieu de relargage. L'appareil à flux continu (figure II-4) utilisé dans ce travail se compose d'un réservoir pour le milieu de dissolution (100 mL), d'une pompe servant à faire circuler le milieu (2 mL.min^{-1}) et de cellules, montées verticalement et munies d'un filtre permettant la rétention des particules. Afin d'assurer un flux constant laminaire au niveau de la cellule, une bille de rubis est déposée au fond de la cellule et un lit de billes de verre de 1 mm de diamètre est placé par-dessus. Les grains chargés sont placés sur le lit de billes de verre. La température du milieu de dissolution est maintenue à 37°C à l'aide d'un bain d'eau thermostaté. La dissolution est assurée par le passage du milieu de relargage et par le renouvellement permanent de l'interface solide-liquide. Un spectrophotomètre UV-visible monté en ligne permet de mesurer la concentration en ibuprofène aux intervalles de temps définis ($\lambda = 264 \text{ nm}$).

La quantité d'ibuprofène libérée dans le tampon phosphate est déduite de la concentration en ibuprofène dans 100 mL de milieu et mesurée par le spectrophomètre UV. Le pourcentage cumulé en ibuprofène libéré (Released %) au temps t (min) est calculé à partir de l'équation II-4:

$$\text{Released \%} = \frac{\text{Masse d'ibuprofène libéré (mg)}}{\text{Masse totale d'ibuprofène (mg)}} \times 100 \quad (\text{eq.II-4})$$

La masse totale de l'ibuprofène adsorbé sur 275 mg des grains chargés a été calculée à partir des DC% des sphéroïdes et les cinétiques de dissolution correspondent à l'évolution du pourcentage d'ibuprofène libéré en fonction du temps.

La libération d'un principe actif peut suivre différents mécanismes tels que la diffusion du principe actif à travers le réseau de pores du substrat, l'érosion du support ou du principe actif ou un mélange des deux mécanismes. Des modèles mathématiques permettent d'identifier le mécanisme limitant la libération du principe actif et de comparer différents profils de dissolution. Les cinétiques de libération obtenues dans ce chapitre ont été modélisées par deux modèles. Le modèle de Higuchi [Higuchi'63], décrit par l'équation II-4, qui est applicable si la diffusion est responsable de la libération du principe actif et le modèle de Hixon-Crowell [Hixon'31], décrit par l'équation II-5, qui est applicable si le mécanisme de libération est de l'érosion.

$$q(\%) = at^{1/2} + b \quad (\text{eq.II-5})$$

$$\sqrt[3]{100} - \sqrt[3]{100 - q} = c \times t \quad (\text{eq.II-6})$$

Pour ces deux équations, q représente le pourcentage dissous d'ibuprofène au temps t , a et c la vitesse de libération et b est une constante de l'équation de Higuchi.

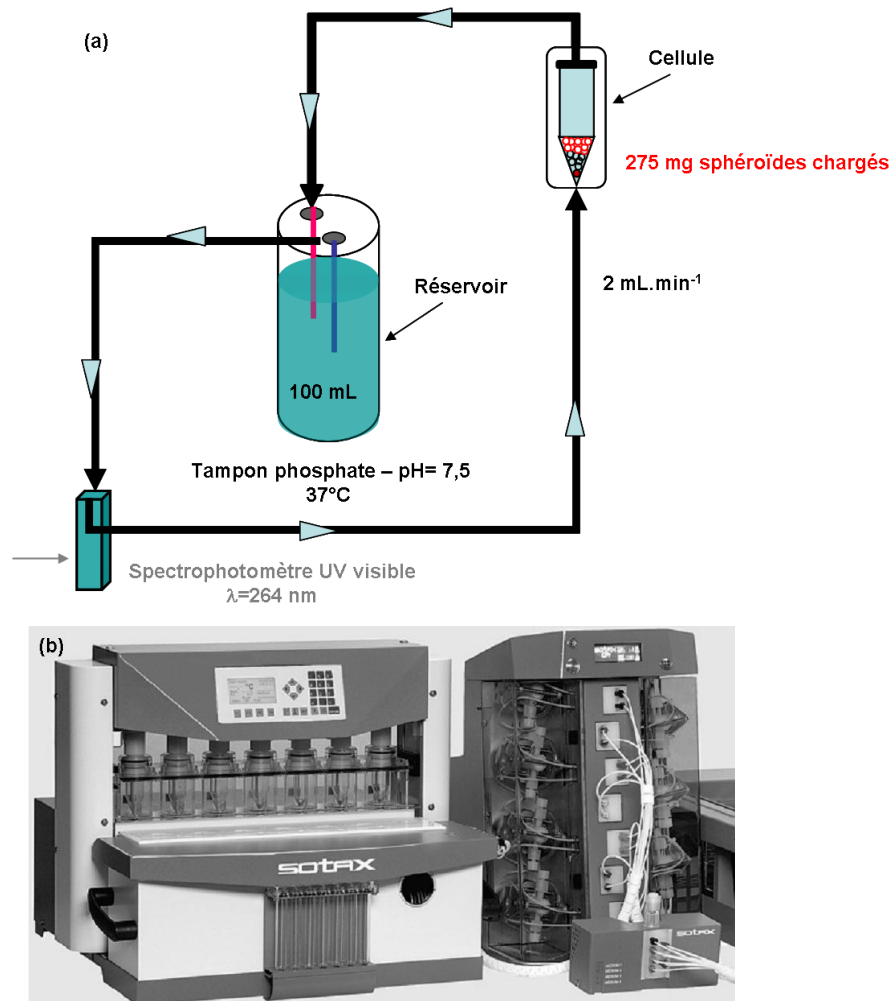


Figure II-4- (a) Schéma de l'appareil de dissolution à flux continu en circuit fermé, (b) cellule à flux continu (CE 7smart, Sotax)

A la fin des tests de dissolution, les sphéroïdes phosphocalciques ont été séparés du milieu de dissolution, puis séchés et caractérisés par diffraction des rayons-X et spectroscopie FT-IR. La comparaison des diffractogrammes et des spectres infrarouges avec ceux effectués avant chargement a montré que les sphéroïdes phosphocalciques gardaient leur structure cristalline et leurs propriétés physicochimiques initiales tout au long des essais de dissolution. Leurs caractéristiques de substitués osseux sont ainsi conservées après la libération de la molécule active. Ces résultats ont été confirmés par la faible teneur en ions Ca^{2+} (mesurée par colorimétrie suivant la méthode o-CPC décrite précédemment) du milieu de dissolution à la fin de l'essai. En effet, les essais ayant été effectués dans un tampon phosphate, un équilibre s'établit entre les sphéroïdes et le milieu induisant une dissolution des sphéroïdes quasi-nulle et donc une concentration en ion calcium dans le milieu proche de zéro [Eliott'94].

Références

- [Chevalier'08] - Chevalier E, Viana M, Cazalbou S and Chulia D. Validation of a manufacturing process of pellets for bone filling and drug delivery. 2008. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*;18:438-44
- [Chevalier'09] - Chevalier E, Viana M, Cazalbou S and Chulia D. Comparison of low-shear and high-shear granulation processes: Effect on implantable calcium phosphate granule properties. 2009. *Drug Development and Industrial Pharmacy*;35:1255-63
- [Emmett'37] - Emmett PH and Brunauer S. The use of low temperature van der Waals adsorption isotherms in determining the surface area of iron synthetic ammonia catalysts. 1937. *Journal of the American Chemical Society*;59:1553-64
- [Elliott'94] - J.C. Elliott. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. 1994. Elsevier Science, Amsterdam.
- [Gracin'02] - Gracin S and Rasmuson AC. Solubility of phenylacetic acid, p-hydroxyphenylacetic acid, p-aminophenylacetic acid, p-hydroxybenzoic acid, and ibuprofen in pure solvents. 2002. *Journal of Chemical and Engineering Data*;47:1379-83
- [Higuchi'63] - Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. 1963. *Journal of Pharmaceutical Science*: 52: 1145–1149.
- [Hixon'31] - Hixson, A.W., Crowell, J.H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. 1931. *Industrial and Engineering Chemistry*: 23: 923–931.
- [Litster'01] - Litster JD, Hapgood KP, Michaels JN, Sims A, Roberts M, Kameneni SK and Hsu T. Liquid distribution in wet granulation: Dimensionless spray flux. 2001. *Powder Technology*;114:32-9
- [Moorehead'74] - Moorehead WR and Biggs HG. 2 Amino 2 methyl 1 propanol as the alkalizing agent in an improved continuous flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. 1974. *Clinical Chemistry*;20:1458-60
- [Raynaud'02a] - Raynaud S, Champion E and Bernache-Assollant D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. 2002a. *Biomaterials*;23:1073-80
- [Raynaud'02b] - Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D and Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. 2002b. *Biomaterials*;23:1065-72
- [Rowe'89] - Rowe RC. Binder-substrate interactions in granulation: A theoretical approach based on surface free energy and polarity. 1989. *International Journal of Pharmaceutics*;52:149-54

II-2- Etude du système sphéroïdes phosphate tricalcique beta/ibuprofène

Article : *β -TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system: Ibuprofen/carrier physicochemical interactions*

Publié dans le journal «*Science and Technology of Advanced Materials*», Volume 12, Numéro 5 du 29 Septembre 2011 (doi:10.1088/1468-6996/12/5/055008)

II-3- Influence de la composition chimique des sphéroïdes
phosphocalciques poreux sur l'adsorption et la libération de l'ibuprofène

Article: *Calcium phosphate porous pellets as drug delivery systems: Effect of drug carrier
composition on drug loading and in vitro release*

«*Journal of the European Ceramic Society*», article sous presse

(doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2012.01.018)

II-4- Influence des paramètres texturaux des sphéroïdes phosphocalciques poreux sur l'adsorption et la libération de l'ibuprofène

Article : *Effect of physical parameters of calcium phosphate porous pellets on ibuprofen loading and delivery properties*

Soumis au journal «Materials science and engineering : C » le Décembre 2011

II-5- Conclusion

Ce chapitre a montré les conséquences de la modification des paramètres liés aux sphéroïdes phosphocalciques (compositions chimiques et textures), sur l'adsorption et l'aptitude à la dissolution *in vitro* de l'ibuprofène dans un tampon phosphate.

Les sphéroïdes obtenus après calcination à des températures supérieures ou égales à 800°C présentent deux catégories de micropores intra-granulaires résultant, respectivement, de l'élimination du porogène/liant et des conditions de frittage des sphéroïdes. Ce réseau de micropores permet l'adsorption des molécules d'ibuprofène et la circulation des fluides biologiques dans les supports. De plus, l'empilement des sphéroïdes d'un diamètre supérieur à 710 µm permet d'avoir une porosité inter-granulaire de l'ordre de 180 µm favorable à la colonisation par les cellules osseuses [Chevalier'09].

Les conséquences, communes aux deux compositions (HA et β -TCP), de l'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes poreux, sont résumées dans le tableau II-3. La diminution de la porosité et de la surface spécifique des sphéroïdes ainsi que la présence d'ibuprofène à la surface des granules après chargement, indiquent que l'ibuprofène s'adsorbe sur les surfaces internes des pores mais également sur les surfaces externes des sphéroïdes. Il a également été montré que quelle que soit la nature du phosphate de calcium, l'adsorption de l'ibuprofène est un phénomène rapide, l'équilibre d'adsorption est atteint après 1 h de mise en contact et la teneur en ibuprofène des sphéroïdes phosphocalciques est proportionnelle à la concentration des solutions en ibuprofène. Plus précisément, l'adsorption de l'ibuprofène suit le modèle de Freundlich, caractéristique d'une adsorption faible d'une molécule sur un substrat et sans saturation des sites potentiels d'adsorption [Barroug'02]. Enfin, la caractérisation physicochimique des sphéroïdes chargés a montré que l'ibuprofène interagissait physiquement avec les granules d'HA et de β -TCP et qu'il était adsorbé *via* des attractions électrostatiques. De ce fait son adsorption est réversible, quelle que soit la composition chimique du substitut.

Composition	Localisation de l'ibuprofène	Modèle d'adsorption	Mécanismes d'adsorption
β -TCP	- Couche hétérogène d'ibuprofène sur la surface	Freundlich	- Physisorption
HA	- Comblement partiel des pores		- Attraction électrostatique - Réversible

Tableau II-3- Caractéristiques de l'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes phosphocalciques poreux

Bien que les mécanismes de l'adsorption de l'ibuprofène soient indépendants des propriétés physicochimiques du support, la quantité d'ibuprofène adsorbé est, elle, liée aux caractéristiques des sphéroïdes. Les variations de composition chimique, de température de la calcination (T_2) et de taille des granules affectent la texture et le réseau poreux des sphéroïdes et par conséquent leur capacité d'adsorption. Par contre la cinétique de dissolution *in vitro* de l'ibuprofène n'est affectée que par la granulométrie des sphéroïdes. L'impact de ces paramètres sur les caractéristiques des sphéroïdes,

leurs capacités d'adsorption en ibuprofène et la dissolution du principe actif sont présentées dans le tableau II-4.

Paramètres	Conséquences		
	Support CaP	Adsorption de l'ibuprofène	Dissolution <i>in vitro</i>
Composition chimique <i>HA vs. β-TCP</i>	Porosité HA > Porosité β-TCP	DC% _{HA} > DC% _{β-TCP}	-Dissolution rapide et totale -Pas de différence HA/β-TCP
Température de calcination (T ₂)	- T ₂ °C ↗ ⇒ Porosité et S _{sp} ↘ <i>Incidence plus marquée sur l'HA</i>	T ₂ °C ↗ ⇒ DC% ↘ <i>Incidence plus marquée sur l'HA</i>	-Dissolution rapide et totale -Pas de différence HA/β-TCP
Taille des sphéroïdes [250-355] vs. [710-1000] μm	∅ ↗ ⇒ { -HA: S _{sp} ↘, porosité ↘ -Pas d'effet sur le β-TCP	DC% _{HA} [710-1000] > DC% _{HA} [250-355] DC% _{β-TCP} [710-1000] = DC% _{β-TCP} [250-355]	Cinétique de dissolution plus rapide pour la fraction [250-355] μm

Tableau II-4- Conséquences de la variation des caractéristiques des supports phosphocalciques sur l'adsorption et la dissolution *in vitro* de l'ibuprofène

Le changement de la composition chimique des sphéroïdes, pour une granulométrie donnée, affecte la quantité d'ibuprofène adsorbé : la capacité d'adsorption des sphéroïdes d'HA est supérieure à celle du β-TCP. Cette différence est liée à la texture des sphéroïdes qui diffère entre les deux compositions chimiques. Les sphéroïdes d'HA ont une porosité supérieure à celle du β-TCP. La porosité des sphéroïdes est conditionnée par les comportements de la poudre durant la granulation [Litster'01-Rowe'89] et le frittage [Raynaud'02], eux-mêmes dépendants de la nature du phosphate de calcium. Par contre, la cinétique de dissolution *in vitro* est inchangée quelle que soit la composition chimique du support. La libération de l'ibuprofène est rapide et totale, ce qui s'explique par la faible intensité des liaisons ibuprofène/phosphate de calcium.

L'augmentation de la température du traitement thermique de 800 °C à 1000 °C diminue la surface spécifique des sphéroïdes et la porosité, notamment la population des pores de la première catégorie ([80-300] nm, ce qui a pour conséquence une diminution du DC%. Le comportement au frittage de l'HA étant différent de celui du β-TCP, les modifications texturales induites par le traitement thermique sont plus marquées sur les sphéroïdes d'HA. L'incidence de la température sur le DC% est par conséquence également plus importante sur les grains d'HA. Cependant, ce changement n'influence pas les interactions HA/ibuprofène et β-TCP/ibuprofène ; elles restent physiques, conduisant à des cinétiques de dissolution *in vitro* similaires, quelle que soit la température du traitement thermique appliqué.

La modification de la taille des sphéroïdes change la porosité et la surface spécifique des granules d'HA mais ces propriétés restent similaires dans le cas des granules de β-TCP. La capacité d'adsorption des granules d'HA peut donc être modulée par la fraction granulométrique de ces sphéroïdes; lorsque la granulométrie augmente le DC% augmente. Pour une composition donnée, les granules dans la petite fraction granulométrique, ici [250-355] μm, engendrent une libération plus rapide que les granules de la grande fraction, [710-1000] μm. La cinétique de libération de l'ibuprofène peut donc être contrôlée par l'ajustement de la taille des sphéroïdes.

Pour conclure, le choix de la composition chimique des sphéroïdes poreux pour un « DDS » dépendra tout d'abord du comportement *in vivo* recherché : les sphéroïdes de β -TCP possèdent une biorésorbabilité élevée et leur présence est donc temporaire, tandis que les sphéroïdes de l'HA peuvent jouer le rôle de support sur une durée plus longue. Ce choix dépendra également de la dose requise d'ibuprofène. Si la dose nécessaire est faible (teneur en ibuprofène < 10% massique), les deux compositions chimiques présentent des capacités d'adsorption suffisantes et donc le choix pourra se faire sur le seul critère de biodégradabilité. En revanche, pour obtenir des sphéroïdes avec des teneurs importantes (20% massique et plus) en ibuprofène, le choix de l'HA semble plus favorable. De plus, l'adsorption physique et réversible de l'ibuprofène sur les sphéroïdes et la libération intégrale du principe actif permettent aux granules de conserver toutes leurs qualités pour une application en tant que substitut osseux.

Références

- [Barroug'02] - Barroug A and Glimcher MJ. Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: Adsorption and release of cisplatin in vitro. 2002. Journal of Orthopaedic Research;20:274-80
- [Chevalier'09] - E. Chevalier, M. Viana, C. Pouget, S. Cazalbou, E. Champion, D. Chulia, From porous pellets fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen, In: Safford M.P.& Haines J.G (Eds.), Bioceramics : Properties, Preparation and Applications in follicular lymphoma and other cancer research, Nova Sciences Publishers, 2009.
- [Litster'01] - Litster JD, Hapgood KP, Michaels JN, Sims A, Roberts M, Kameneni SK and Hsu T. Liquid distribution in wet granulation: Dimensionless spray flux. 2001. Powder Technology;114:32-9
- [Raynaud'02] - Raynaud S, Champion E and Bernache-Assollant D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. 2002. Biomaterials;23:1073-80
- [Rowe'89] - Rowe RC. Binder-substrate interactions in granulation: A theoretical approach based on surface free energy and polarity. 1989. International Journal of Pharmaceutics;52:149-54

Chapitre III

Etude de l'imprégnation *ex situ* des sphéroïdes phosphocalciques

III-1- Introduction

L'étude bibliographique de ce travail sur la fonctionnalisation thérapeutique des biocéramiques phosphocalciques dans le but d'en faire des systèmes de délivrance de molécule active (DDS) a montré que les principes actifs peuvent être incorporés au sein du support soit par incorporation *in situ*, soit par incorporation *ex situ*.

L'incorporation *in situ* est l'inclusion du principe actif au cours de la synthèse du biomatériau par formation d'un complexe avec un des précurseurs de la poudre céramique [Banerjee'11] ou pendant le procédé de mise en forme par mélange du principe actif avec la poudre céramique [Moldovan'94-Yamashita'98]. Cette méthode a l'avantage de permettre l'incorporation de la totalité de la quantité requise de principe actif à l'intérieur de la biocéramique phosphocalcique. Cependant, à cause de l'instabilité et de la dégradation de la majorité des molécules actives à des températures supérieures à 300°C, cette méthode n'est pas compatible avec un procédé d'élaboration nécessitant un frittage ou un traitement thermique du DDS après sa mise en forme.

L'incorporation *ex situ* consiste à imprégner la biocéramique préalablement fabriquée par une solution contenant le principe actif. De ce fait, cette méthode a l'avantage de permettre un traitement thermique de la céramique visant à accroître ses propriétés mécaniques [Cornell'93]. L'incorporation du principe actif se fait par adsorption sur le support, la quantité de principe actif adsorbée dépendant non seulement des propriétés physico-chimiques de la molécule active et du support, mais aussi des paramètres d'imprégnation. En effet, l'adsorption de la molécule active sur la surface du support et à partir de la solution de chargement, est déterminée par l'affinité relative de la molécule pour la surface du support et pour la solution de chargement. Ces propriétés intrinsèques au couple support/principe actif peuvent être partiellement modulées par les caractéristiques du milieu de chargement. En outre, la concentration en principe actif, le pH, la nature du solvant et la température de la solution d'imprégnation influencent la physicochimie de la surface du support et la solubilité de la molécule active. Par ailleurs, l'application d'une agitation et/ou d'une pression peut affecter les gradients de concentration du principe actif dans le milieu de chargement et donc déplacer l'équilibre d'adsorption (eq.III-1). Il apparaît ainsi nécessaire d'évaluer l'incidence de tous ces paramètres sur la quantité de PA adsorbée, sa localisation sur les supports poreux et sa dissolution, afin de maîtriser et adapter les caractéristiques du DDS aux besoins thérapeutiques.



L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux de chargement sur l'adsorption de l'ibuprofène par les supports phosphocalciques poreux. Cette étude a été réalisée sur la fraction granulométrique [710-1000] μm des grains de β -TCP. La poudre utilisée est présentée dans l'annexe 2, la mise en forme des grains et leur caractérisation dans le chapitre II. Quatre

paramètres ont été étudiés : le solvant, la température, l'agitation et le nombre de cycles d'imprégnation (figure III-1).

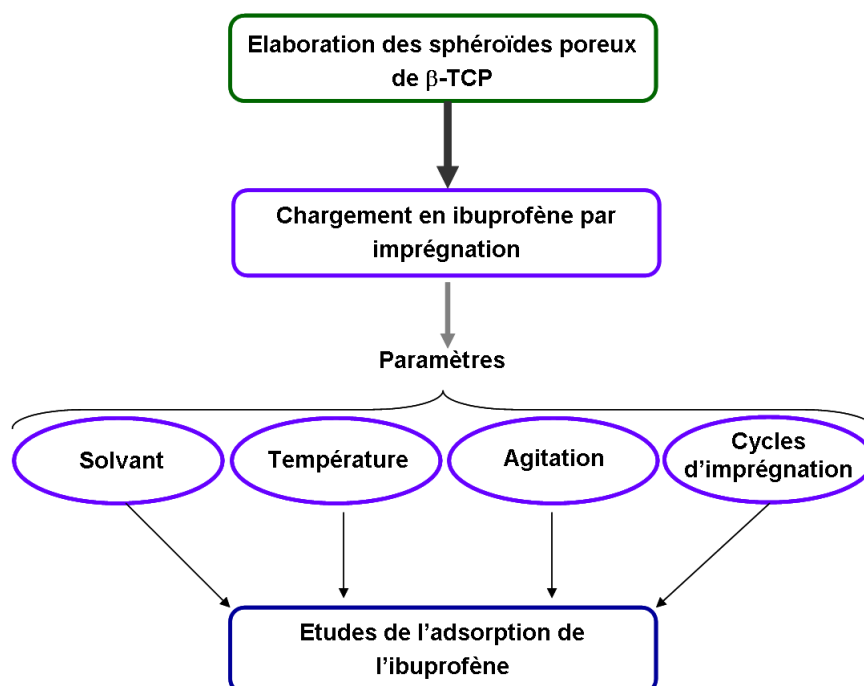


Figure III-1- Etude de l'adsorption par imprégnation *ex situ* de l'ibuprofène sur les sphéroïdes poreux de β -TCP

L'impact du solvant sur le chargement du substrat en principe actif a été étudié en utilisant des solvants ayant des propriétés physicochimiques (polarité, polarisabilité, viscosité et point d'ébullition) différentes. Ces essais d'imprégnation ont été conduits à température ambiante, sans agitation, selon le protocole opératoire décrit dans le chapitre II. Afin d'étudier l'influence de la température sur l'imprégnation, des isothermes d'adsorption ont été effectuées à 25°C et 35°C, dans l'éthanol et sans agitation. L'effet de l'agitation a été étudié en appliquant une agitation de 80 rpm (agitateur « orbital platform »). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions, c'est-à-dire dans les solutions éthanoliques et à température ambiante, mais sans agitation. Enfin, pour déterminer si des imprégnations successives pouvaient affecter la quantité d'ibuprofène adsorbée, le protocole de chargement a été répété deux puis trois fois sur les sphéroïdes poreux de β -TCP préalablement imprégnés par une solution éthanolique d'ibuprofène à 200 mg.mL⁻¹, à température ambiante et sans agitation.

L'exploitation des différentes expériences est basée d'une part sur la caractérisation des grains chargés et la détermination du *Drug Content* (équation II-2) et d'autre part sur l'aspect thermodynamique de l'équilibre d'adsorption (éq.III-1). Pour ce faire, les variations de l'enthalpie libre standard ($\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$ - kJ.mol⁻¹) liées à l'adsorption de l'ibuprofène à la surface des sphéroïdes ont été calculées au moyen de l'équation III-2 (éq.III-2) :

$$\Delta G^{\circ}_{\text{ads}} (\text{kJ.mol}^{-1}) = -RT \ln K \quad (\text{éq.III-2})$$

où R est la constante universelle des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T (K) la température à laquelle l'adsorption est effectuée. La constante d'équilibre d'adsorption de l'ibuprofène K, a été préalablement calculée à partir des résultats expérimentaux et de l'équation III-3 :

$$K(\text{L.g}^{-1}) = \frac{C_s(\text{mg.g}^{-1})}{C_e(\text{mg.L}^{-1})} \quad (\text{éq.III-3})$$

où C_s est la masse d'ibuprofène adsorbé par unité de masse des sphéroïdes (mg.g^{-1}) et C_e (mg.L^{-1}) la concentration en ibuprofène dans les solutions d'imprégnation à l'équilibre ($t_{\text{éq}} = 1 \text{ h}$).

Parallèlement, des essais de dissolution *in vitro* ont été effectués, dans les mêmes conditions que ceux réalisés dans le chapitre II, afin d'évaluer l'incidence des conditions de chargement sur le relargage de l'ibuprofène.

L'ensemble des résultats de cette étude est présenté et discuté dans l'article « *β -tricalcium phosphate porous pellets for local ibuprofen delivery: effect of impregnation parameters on drug content adjustment and drug release*».

Références

- [Banerjee'11] - Banerjee SS, Roy M and Bose S. PH tunable fluorescent calcium phosphate nanocomposite for sensing and controlled drug delivery. 2011. *Advanced Engineering Materials*;13:B10-B7
- [Cornell'93] - Cornell CN, Tyndall D, Waller S, Lane JM and Brause BD. Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. 1993. *Journal of Orthopaedic Research*;11:619-26
- [Moldovan'94] - Moldovan KM and Bajpai PK. A ceramic system for continuous release of acetylsalicylic acid. 1994. *Biomedical Sciences Instrumentation*;30:175-80
- [Yamashita'98] - Yamashita Y, Uchida A, Yamakawa T, Shinto Y, Araki N and Kato K. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. 1998. *International Orthopaedics*;22:247-51

III-2- Etude de l'imprégnation des sphéroïdes phosphocalciques par des solutions organiques de l'ibuprofène

Article: β -tricalcium phosphate porous pellets for local ibuprofen delivery: effect of impregnation parameters on drug content adjustment and drug release

III-3- Conclusion

Le procédé d'incorporation d'un principe actif dans un support poreux par imprégnation simple (*i.e.* imprégnation sans applicatoir de vide) consiste en trois étapes principales (tableau III-2). Après l'immersion du support poreux dans une solution contenant le principe actif, les surfaces externes et internes du solide sont mouillées par la solution et les pores comblés lors de la montée capillaire de la phase liquide [Stahli'10]. Une fois le contact établi entre la phase liquide et la surface du solide, l'adsorption de la molécule active se produit à l'interface de solide/liquide. Puis, les supports chargés sont séparés de leur surnageant et séchés afin d'éliminer les résidus de solvant. La quantité de principe actif adsorbée par le substrat est influencée par les facteurs contrôlant chacune des étapes du procédé d'incorporation de la molécule active (tableau III-2). Fixer l'adsorbant et l'adsorbé, permet de s'affranchir d'une partie de ces facteurs. C'est pourquoi, l'influence des paramètres d'imprégnation tels que nature du solvant, la température, l'agitation et le nombre de cycle d'imprégnations, sur l'adsorption de l'ibuprofène ont été étudiés pour un seul substrat, *i.e.* les sphéroïdes poreux de β -TCP.

Etapes d'incorporation du PA	Facteurs influents	
	Paramètres liés au support ou PA	Paramètres liés à l'imprégnation
1 Mouillage du solide et comblement des pores par le liquide	<ul style="list-style-type: none"> • Porosité du support (taille, interconnection, morphologie des pores) • Physico-chimie de la surface solide 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvant • Température • Pression
2 Adsorption à l'interface solide/liquide	<ul style="list-style-type: none"> • Physico-chimie de la surface solide • Solubilité de la molécule active dans le solvant 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvant • Température • Concentration • Agitation
3 Séchage	-	Solvant

Tableau III-2- Etapes d'incorporation d'un principe actif par imprégnation simple et facteurs contrôlant la quantité et la localisation de PA adsorbé

Au cours de cette étude, il a été mis en évidence que le mécanisme d'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes de β -TCP n'était pas lié aux paramètres d'imprégnation. En effet, quelles que soient les conditions d'imprégnation, la quantité d'ibuprofène adsorbée (DC%) augmente linéairement avec la concentration initiale en ibuprofène et les isothermes d'adsorption suivent toutes le modèle de Freundlich, traduisant une adsorption non homogène du principe actif à la surface des sphéroïdes et une non saturation des sites d'adsorption Plus précisément, les variations des constantes du modèle, *i.e.* la capacité d'adsorption (a) et l'affinité d'adsorption (m), d'une condition à l'autre, sont très faibles.

Enfin, les valeurs de l'affinité d'adsorption ($m \geq 1$) et les variations d'enthalpie libre liées à la réaction d'adsorption ($-20 < \Delta G^{\circ}_{ads} < 0 \text{ kJ.mol}^{-1}$) montrent que le mécanisme d'adsorption répond à des interactions physiques.

Parallèlement, la quantité d'ibuprofène adsorbée, *i.e.* le *Drug Content* (DC%), et la cinétique de dissolution *in vitro* sont influencées par certains des facteurs d'imprégnation. L'ensemble des variations des propriétés du DDS « sphéroïdes poreux de β -TCP/Ibuprofène » en fonction de ces facteurs sont récapitulées dans le tableau III-3.

Facteurs d'imprégnation	Effets attendus	Conséquences	
		Adsorption	Dissolution
Solvant polaire	Equilibre IBU*/Solution	$DC\%_{aprotique} > DC\%_{protique}$ $BP^* \uparrow \Rightarrow$ IBU adsorbé sur la surface \uparrow	$BP \uparrow \Rightarrow$ cinétique plus rapide
Température	Solubilité de l'IBU	pas d'effet	nd
Agitation	Gradient de concentration IBU à l'interface solide/solution	pas d'effet	nd
Imprégnation successive	Etat d'équilibre IBU adsorbé/IBU total	Cycle n°1 \rightarrow Cycle n°2 : $DC\% \uparrow$ Cycle n°2 \rightarrow Cycle n°3 : $DC\% \approx$	nd

* IBU : Ibuprofène, BP : point d'ébullition

Tableau III-3- Effets des paramètres d'imprégnation sur les propriétés du DDS « sphéroïdes poreux de β -TCP/ibuprofène »

Les *Drug Contents* obtenus sont fonctions du caractère protique ou non des solvants : les DC% des solvants aprotiques sont similaires ($DC\%_{acétone} \approx DC\%_{dichlorométhane}$) et supérieurs à ceux des solvants protiques, eux-mêmes similaires ($DC\%_{éthanol} \approx DC\%_{méthanol}$). En effet, les solvants protiques, tels que les alcools, sont capables de former des liaisons hydrogènes avec le groupement carboxyle de la molécule d'ibuprofène ce qui n'est pas possible dans le cas de solvants aprotiques tels que le dichlorométhane ou l'acétone.

Lors de la dissolution *in vitro* de l'ibuprofène à partir de grains chargés dans de l'éthanol ou dans de l'acétone, deux comportements distincts ont été observés : la dissolution est plus lente dans le cas d'un chargement en solution éthanolique. Ce comportement peut être relié aux points d'ébullition des deux solvants. En effet l'acétone a un point d'ébullition plus faible que celui de l'éthanol, ce qui peut conduire lors de l'étape de séchage, à une accumulation de l'ibuprofène à l'entrée des pores, près de la surface externe des sphéroïdes. Cette localisation rend le principe actif plus accessible au milieu de dissolution et donc sa libération est plus rapide.

Malgré l'augmentation de la solubilité de l'ibuprofène dans l'éthanol par l'augmentation de la température [Civan'01], la quantité d'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes de β -TCP n'a pas été affectée par ce facteur, dans les conditions de l'expérience. L'agitation du milieu d'imprégnation permet de renouveler la solution à la surface du solide. Dans ce travail, la mise en œuvre d'une

agitation à 80 rpm n'a pas permis d'augmenter la quantité d'ibuprofène adsorbé et ce probablement à cause de l'établissement très rapide de l'état d'équilibre entre les sphéroïdes poreux et la solution d'ibuprofène.

Les imprégnations successives ont permis d'augmenter le DC% d'environ 2%. Cette augmentation est due à une modification de l'équilibre d'adsorption. En effet, il a été montré dans le chapitre II-1 que l'adsorption de l'ibuprofène sur les grains de β -TCP était réversible et que donc la quantité d'ibuprofène adsorbé dépendait de la quantité totale d'ibuprofène présent dans le système, *i.e.* le milieu de chargement.

En résumé, pour le système étudié et pour une concentration donnée de la solution d'imprégnation, le choix du solvant est le paramètre permettant de moduler les caractéristiques du DDS. La quantité de principe actif adsorbé sur le support poreux sera d'autant plus importante que le solvant est polaire et aprotique. D'un autre côté, un chargement effectué dans un solvant polaire et protique donnera lieu à des cinétiques de libération moins rapides.

Références

[Civan'01] - Civan F. Scale effect on porosity and permeability: Kinetics, model, and correlation. 2001. *AIChE Journal*;47:271-87

[Stahli'10] - Stahli C, Bohner M, Bashoor-Zadeh M, Doebelin N and Baroud G. Aqueous impregnation of porous β -tricalcium phosphate scaffolds. 2010. *Acta Biomaterialia*;6:2760-72

Chapitre IV

Quantification et localisation de l'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes phosphocalciques

IV-1- Introduction

Dans l'étude des propriétés et des potentiels des DDS, l'évaluation de la teneur en principe actif est une donnée importante mais sa localisation sur le support joue également un rôle non négligeable. Le développement d'un DDS par incorporation *ex situ* du principe actif exige une quantification précise du principe actif afin de répondre aux exigences thérapeutiques. De plus, par cette méthode, le principe actif est adsorbé à la fois sur la surface externe des granules et à l'intérieur des pores. Cette distribution affecte sa disponibilité et par là même les mécanismes qui régissent sa libération. Ainsi, il a été montré dans les chapitres précédents que, dans le cas de l'ibuprofène adsorbé physiquement sur le support phosphocalcique, la fraction déposée sur les surfaces externes se libère rapidement, alors que la partie adsorbée à l'intérieur des pores doit, après dissolution, diffuser *via* le réseau poreux vers l'extérieur du DDS. Pour développer un système de délivrance contrôlée et efficace, il apparaît donc nécessaire de mettre en œuvre une stratégie de caractérisation la plus complète possible.

Afin de doser précisément la quantité d'ibuprofène adsorbé et définir sa répartition sur les différentes surfaces offertes par les grains, plusieurs méthodes de caractérisation ont été comparées. L'objectif de ce chapitre est de déterminer la pertinence, les avantages et les limites de chacune d'entre elles.

Cette étude est réalisée sur la fraction granulométrique [250-355] μm des grains d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate tricalcique beta (β -TCP). Les poudres utilisées pour la fabrication de ces sphéroïdes sont présentées dans les annexes 1 et 2, la mise en forme et la caractérisation de sphéroïdes poreux dans le chapitre II. Les sphéroïdes poreux ont été imprégnés par des solutions éthanoliques d'ibuprofène de concentrations variables (25, 100 et 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), suivant le protocole présenté dans la partie II-1-2 du chapitre II. Les DDS obtenus ont ensuite été caractérisés qualitativement et quantitativement par spectrophotométrie UV-Visible, par analyse thermogravimétrique (ATG) et par spectroscopie de diffusion Raman (figure IV-1).

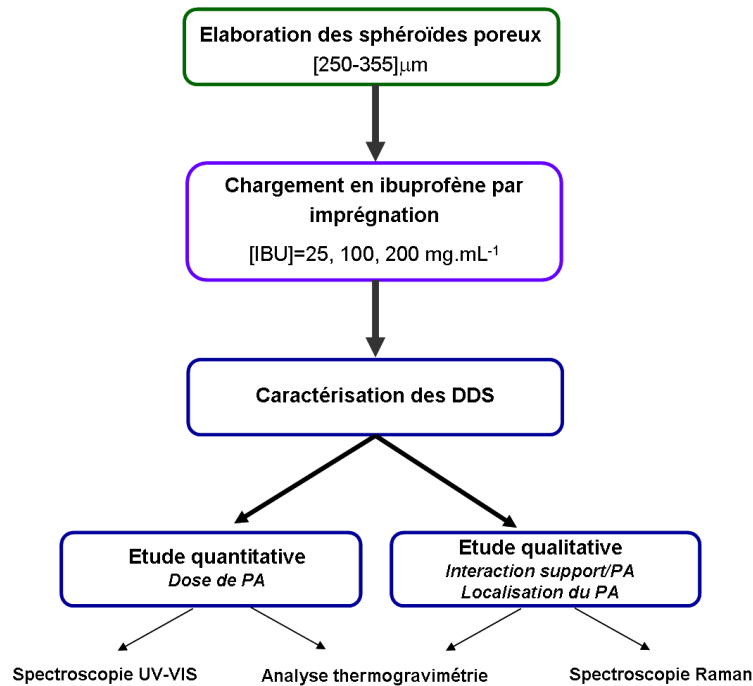


Figure IV-1- Quantification et localisation du principe actif (PA) adsorbé sur les sphéroïdes phosphocalciques

L'ibuprofène adsorbé par les grains a tout d'abord été quantifié par spectrophotométrie UV-Visible suivant le protocole décrit dans le paragraphe II-1-2. La masse d'ibuprofène obtenue a été ensuite exprimée par rapport à la masse des sphéroïdes chargés (équation II-1, chapitre II) et sera notée DC_{UV} (exprimé en pourcentage) par la suite. Les incertitudes relatives et absolues de cette méthode de dosage ont été calculées selon l'équation. IV-1. m_{IBU} représente la masse d'ibuprofène déduite de la concentration mesurée, C_{UV} dans les solutions d'extraction, V_{sol} le volume des solutions d'extraction (40 mL) et m_{sample} la masse de sphéroïdes chargés immergés dans l'éthanol.

$$DC_{UV} = \frac{m_{IBU} \text{ (mg)}}{m_{sample} \text{ (mg)}} \times 100 = \frac{C_{UV} \text{ (mg.mL}^{-1}) \times V_{sol} \text{ (mL)}}{m_{sample} \text{ (mg)}} \times 100 \quad (\text{eq.II-1})$$

$$\frac{\Delta DC_{UV}}{DC_{UV}} \% = \left[\frac{\Delta C_{UV} \text{ (mg.mL}^{-1})}{C_{UV} \text{ (mg.mL}^{-1})} + \frac{\Delta V_{sol} \text{ (mL)}}{V_{sol} \text{ (mL)}} + \frac{\Delta m_{sample} \text{ (mg)}}{m_{sample} \text{ (mg)}} \right] \times 100 \quad (\text{eq. IV - 1})$$

Les analyses thermogravimétriques (ATG) ont été effectuées sous air, entre 25°C et 800°C avec une rampe en température de 5°C.min⁻¹. La stabilité thermique des sphéroïdes chargés ainsi que leur perte de masse ont été étudiées. Les pertes de masse des sphéroïdes ont été attribuées à l'élimination des molécules d'ibuprofène. Ces pertes de masse ont été analysées de manière à calculer le DC_{TG} (équation. IV-2). La perte de masse obtenue à 600°C (m_{TG}) est divisée par la masse des sphéroïdes chargés (m_{sample}) utilisée pour l'analyse thermique, soit environ 250 mg. Les incertitudes relatives et absolues des DC_{TG} obtenus ont été ensuite calculées suivant l'équation IV-3.

$$DC_{TG} = \frac{m_{TG} \text{ (mg)}}{m_{\text{sample}} \text{ (mg)}} \times 100 \quad (\text{éq. IV-2})$$

$$\frac{\Delta DC_{TG}}{DC_{TG}} \% = \left[\frac{\Delta m_{TG} \text{ (mg)}}{m_{TG} \text{ (mg)}} + \frac{\Delta m_{\text{sample}} \text{ (mg)}}{m_{\text{sample}} \text{ (mg)}} \right] \times 100 \quad (\text{eq. IV-3})$$

Dans un premier temps, la comparaison des méthodes d'analyses thermique (ATG) et spectrophotométrique (UV-visible) a conduit à une argumentation sur les intérêts et les limites de ces deux techniques pour le dosage de principes actifs dans le cadre des DDS. Dans un deuxième temps les résultats obtenus par ATG ont été analysés plus en détails. Les pertes de masse se faisant par paliers, ces derniers ont été corrélés aux différentes localisations de l'ibuprofène, c'est-à-dire à la surface des sphéroïdes ou à l'intérieur des pores.

Les analyses par spectroscopie Raman ont permis d'analyser les interactions entre la molécule active et les supports phosphocalciques mais également d'évaluer les quantités d'ibuprofène adsorbées à la surface des sphéroïdes en fonction de leur nature (β -TCP ou HA) et de la concentration de la solution d'imprégnation. En effet la profondeur d'analyse du laser (1 μm), étant considérablement inférieure à la taille des sphéroïdes étudiés, cette méthode a été considérée comme une technique d'analyse de la surface des granules chargés. En raison de l'hétérogénéité de la couche d'ibuprofène sur la surface des sphéroïdes, 3 zones d'acquisition réparties aléatoirement ont dues être moyennées pour chaque échantillon. Enfin les intensités intégrées des pics de l'ibuprofène dans l'intervalle de 2800 à 3100 cm^{-1} ont été corrélées à la concentration en ibuprofène de la solution d'imprégnation.

La combinaison des approches qualitatives et quantitatives de ces méthodes de caractérisation a confirmé la possibilité d'un dosage précis de l'ibuprofène physisorbé mais également sa localisation. Les résultats ont montré que la teneur en ibuprofène des sphéroïdes augmentait avec la concentration des solutions d'imprégnation et que la molécule active s'adsorbait préférentiellement dans les pores des sphéroïdes de β -TCP et sur la surface externe pour les sphéroïdes d'HA.

IV-2- Quantification et localisation de l'ibuprofène adsorbé sur les sphéroïdes phosphocalciques

Article : *Analytical approach to drug delivery systems evaluation: case of ibuprofen adsorption on porous calcium phosphate pellets*

Conclusion

Lors d'une perte de substance osseuse conséquence, la cicatrisation spontanée et naturelle est insuffisante pour combler la cavité osseuse. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un substitut osseux afin d'apporter un soutien mécanique à la zone traumatisée et fournir une surface favorisant la cicatrisation. Les propriétés très favorables des biocéramiques phosphocalciques (bioactivité, biorésorbabilité et ostéoconduction) font de ces matériaux des substituts synthétiques de choix pour le traitement des défauts osseux. Ces dernières années, dans l'objectif de permettre un traitement local de pathologies telles que les infections ou les tumeurs osseuses mais également afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique de patients souffrant de pathologies musculo-squelettiques de type inflammatoire ou ostéoporotique, une nouvelle génération de biocéramiques phosphocalciques intégrant une molécule active s'est développée. Ces supports assurent ainsi la double fonction de substitut osseux et de vecteur de substance active, pour une libération localisée sur le site d'implantation. Le développement et la fabrication de ces systèmes combinés, connus sous le nom de « *Drug Delivery System* » ou DDS, nécessitent une connaissance approfondie des paramètres déterminant les propriétés fonctionnelles du système. En outre l'ostéoconduction doit être maintenue tout en garantissant la libération de la dose thérapeutique nécessaire sur une durée adaptée. Dans le cas des systèmes élaborés par adsorption de la molécule active sur le support biocéramique, les caractéristiques physico-chimiques du substrat et du principe actif ainsi que les conditions d'imprégnation sont déterminantes.

Ce travail était destiné à l'étude du DDS sphéroïdes phosphocalciques poreux/ibuprofène. Le mécanisme d'adsorption, la quantité adsorbée, la localisation et les cinétiques de dissolution *in vitro* de l'ibuprofène ont été étudiés pour des sphéroïdes de composition chimique, texture et granulométrie variables. L'incidence des paramètres d'imprégnation (solvant, température, nombre de cycles) a également été évaluée.

Il s'est avéré que le mécanisme d'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes ne dépendait ni des propriétés physicochimiques des supports, ni des facteurs d'imprégnation. Le principe actif est adsorbé par physisorption sur les sphéroïdes d'HA et de β -TCP, quelles que soient les conditions de chargement.

Cependant, la quantité d'ibuprofène adsorbé, ou *drug content* des sphéroïdes, dépend indirectement de la composition chimique des supports *via* l'influence que cette dernière opère lors de la mise en forme. En effet il a été montré que, en raison de leur porosité plus élevée, les grains d'HA présentent une capacité d'adsorption supérieure à celle des grains de β -TCP. Par ailleurs la porosité et la surface spécifique, modulées par la température du traitement thermique des substrats, influencent également la quantité d'ibuprofène adsorbé ; les plus fortes teneurs en ibuprofène sont obtenues pour les sphéroïdes présentant une surface et un volume poreux élevés. Enfin le choix d'un solvant polaire/aprotique favorise l'adsorption de l'ibuprofène sur les sphéroïdes du β -TCP, tout en gardant le même mécanisme d'adsorption.

Les caractérisations physico-chimiques des sphéroïdes chargés, par porosimétrie à mercure, spectrophotométrie UV, analyse thermogravimétrique et spectroscopie Raman, ont montré que l'ibuprofène était adsorbé sur les surfaces externes mais également internes des sphéroïdes d'HA et de β -TCP. Cependant, la répartition de l'ibuprofène diffère selon la composition du support : la proportion d'ibuprofène adsorbé sur les surfaces externes des sphéroïdes d'HA est plus importante que dans le cas des sphéroïdes de β -TCP.

Enfin, la cinétique de dissolution dépend de la taille des sphéroïdes ainsi que du solvant utilisé pour l'imprégnation. Le rapport surface/volume est plus faible pour les supports sphériques de grande dimension ce qui conduit à un ralentissement de la dissolution de l'ibuprofène. En ce qui concerne la nature du solvant, c'est le point d'ébullition qui agirait sur la cinétique de dissolution par une modification de la localisation de l'ibuprofène adsorbé. Une température d'ébullition faible pourrait conduire à une adsorption préférentielle de l'ibuprofène au niveau des surfaces externes lors du séchage des sphéroïdes et donc une dissolution plus rapide.

Afin de compléter ce travail, plusieurs points pourraient être approfondis pour comprendre au mieux les interactions principe actif/substrat, les cinétiques d'imprégnation et les mécanismes de dissolution et répondre à la question : comment moduler les caractéristiques d'un DDS (propriétés du substrat, doses et cinétiques de libération pour un principe actif donné) pour être capable de proposer une solution adaptée à chaque cas clinique ? A cet effet, plusieurs approches peuvent être considérées.

Pour une meilleure compréhension du système combiné sphéroïdes phosphocalciques poreux/ibuprofène, il serait intéressant de mesurer les tensions interfaciales liquide/solide ainsi que les charges de surfaces des sphéroïdes dans diverses solutions d'ibuprofène. Parallèlement, des cinétiques d'imprégnations sur une gamme de température permettraient d'obtenir les enthalpies et entropie de physisorption du principe actif. Ces différentes mesures permettraient de renforcer les connaissances sur les mécanismes d'adsorption de l'ibuprofène sur les phosphates de calcium.

L'étude du DDS sphéroïdes phosphocalciques poreux/anti-inflammatoire pourrait également être complétée par l'incorporation d'une molécule active présentant une stéréochimie et un encombrement stérique différents de l'ibuprofène (e.g. ibuprofène-lysine) ce qui permettrait de vérifier l'effet de la tortuosité du réseau de pores des sphéroïdes sur l'adsorption et la libération de la molécule active. Par ailleurs, les comportements des sphéroïdes en HA et en β -TCP au contact de solutions aqueuses étant très différents et dans l'optique d'envisager le chargement de molécules hydrosolubles sur ces supports, il serait nécessaire de prolonger cette étude par des analyses en milieu aqueux.

L'incidence directe de la porosité des supports sur les caractéristiques du DDS proposé ayant été mise en évidence dans ce travail, d'autres pistes peuvent être envisagées pour moduler le réseau de pores intra-granulaires et sa tortuosité comme par exemple l'emploi de porogènes ou d'une association de porogènes présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes (granulométrie, solubilité, température de dégradation...). Il serait alors intéressant de relier ces variations de texture poreuse à des données de mécanique des fluides.

Afin de valider le concept proposé dans ce travail, il serait nécessaire de vérifier que le procédé de chargement ne dégrade pas l'activité thérapeutique de la molécule active mais également que cette fonctionnalisation ne perturbe pas la biocompatibilité et la bioactivité/biorésorbabilité *in vivo* de ces supports phosphocalciques. De plus, au-delà de la caractérisation *in vitro* qui doit être la plus complète possible pour pouvoir contrôler tous les paramètres du système, la transposition clinique de ce traitement localisé nécessite des évaluations *in vivo* afin d'établir les cinétiques de libération *in situ*. Les critères thérapeutiques (concentration locale requise et durée de libération de la molécule active) varient de manière très importante selon la pathologie à traiter, il s'agit d'être capable de moduler les caractéristiques du DDS en fonction du besoin clinique.

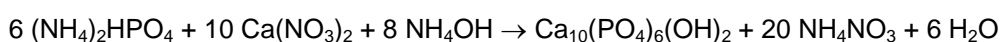
Annexes

Annexe 1

Synthèse et caractérisation du lot de poudre d'hydroxyapatite stœchiométrique

Synthèse des poudres

L'hydroxyapatite phosphocalcique ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – HA ; Ca/P = 10/6) utilisée pour ce travail a été synthétisée, au laboratoire, par voie hydrothermale selon la réaction suivante :



La maîtrise de la composition de l'hydroxyapatite synthétisée dépend du contrôle de nombreux paramètres tels que : le rapport molaire Ca/P en réactif, la température ainsi que l'atmosphère et le pH au sein du réacteur, la vitesse d'addition des réactifs, le temps de maturation. Ces paramètres de synthèse ont été étudiés et optimisés au laboratoire au cours des travaux de thèse de doctorat de Sylvie Raynaud [Raynaud'02]. De ce fait, les conditions expérimentales utilisées dans le présent travail en sont tirées et sont récapitulées dans le tableau A-1.

Une solution de nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Aldrich) est introduite au sein d'un réacteur de 10 L (figure A-1). Cette solution est chauffée à la température de $90,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, température qui sera maintenue constante tout au long de la synthèse et de l'étape de maturation. Puis, une solution de dihydrogénophosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - Aldrich) est ajoutée à débit constant à la solution de nitrate de calcium. Le pH du milieu réactionnel est maintenu constant ($\text{pH } 8,5 \pm 0,1$) à l'aide d'une solution d'ammoniaque NH_4OH concentrée. Le milieu est maintenu sous agitation et balayage d'argon durant la synthèse et l'étape de maturation afin de limiter la carbonatation de l'hydroxyapatite. Le gel obtenu est centrifugé et lavé à l'eau distillée afin d'éliminer les résidus de synthèse, puis séché à l'étuve ($80^\circ\text{C}/24 \text{ h}$).

Solution de nitrate de calcium	$[\text{Ca}^{2+}] = 1,28 \text{ mol.L}^{-1} - V_{\text{solution}} = 2 \text{ L}$
Solution de dihydrogénophosphate d'ammonium	$[\text{PO}_4^{3-}] = 1,28 \text{ mol.L}^{-1} - V_{\text{solution}} = 1,2 \text{ L}$
pH	$8,5 \pm 0,1$
Température	$90,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$
Débit d'ajout de la solution de phosphate	40 mL.min^{-1}
Temps de maturation	60 min
Débit d'argon	5 L.min^{-1}

Tableau A-1- Conditions expérimentales utilisées pour la synthèse de l'hydroxyapatite stœchiométrique

Afin d'obtenir la quantité de poudre d'HA requise pour l'élaboration des grains poreux, soit environ 1 kg de poudre, 15 synthèses ont été effectuées. La conformité de chaque synthèse, c'est-à-dire le respect d'un rapport molaire Ca/P égal à 10/6 correspondant à une hydroxyapatite stœchiométrique, a

été vérifiée comme suit, puis les différentes synthèses ont été réunies en un seul et même lot de poudre.

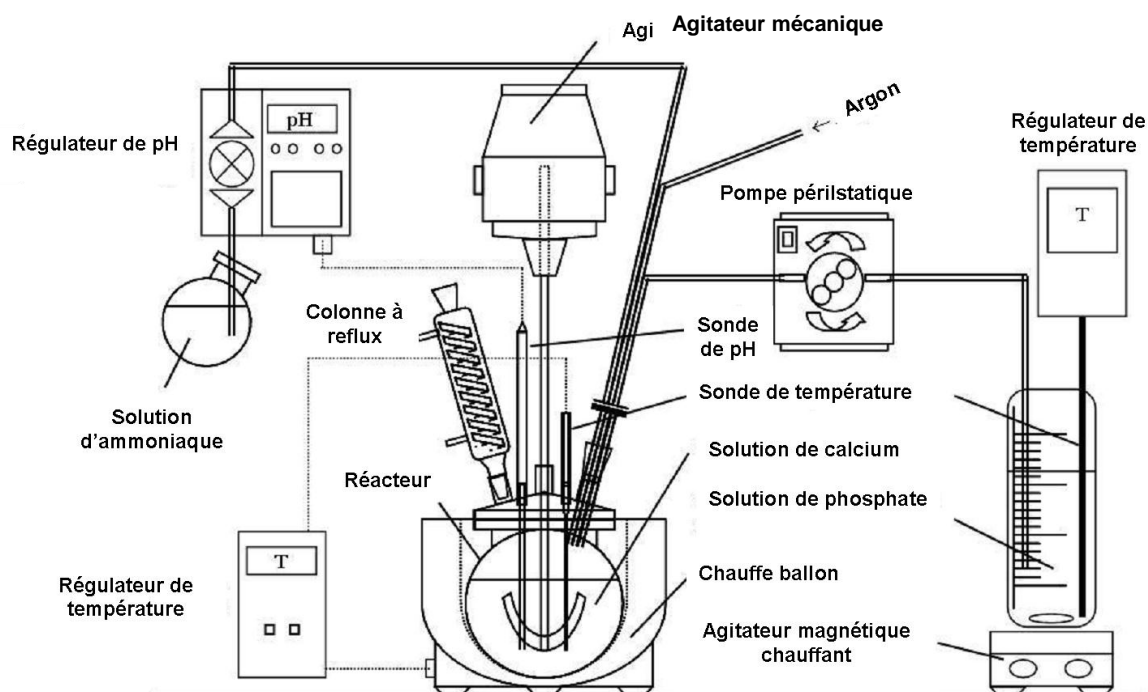


Figure A-1 : Schéma du montage du réacteur de synthèse par précipitation en voie aqueuse

Détermination du rapport molaire Ca/P des poudres d'hydroxyapatite synthétisées

La stœchiométrie de l'hydroxyapatite obtenue est évaluée par sa stabilité thermique [Raynaud'01]. Quelques grammes de poudre sont calcinés à 1000°C durant 15h dans un four de type Super Kanthal. [Afnor'08]. Si la poudre est sous-stœchiométrique ($Ca/P < 10/6$) alors le traitement thermique conduit à sa décomposition en HA et en β -TCP. Ces phases seront visibles sur les diffractogrammes et identifiées par comparaison avec les références du fichier ICDD-PDF, *International Center for Diffraction data – Powder Diffraction Files* (Fiche N°00-09-0432 pour l'HA et N°00-09-0169 pour le β -TCP). Si la poudre est sur-stœchiométrique ($Ca/P > 10/6$) alors le traitement thermique conduit à sa décomposition en HA et en chaux vive, CaO (Fiche N°00-013-1497). Avant toute analyse par diffraction des rayons X, la présence de ce composé est décelée par un test à la phénolphtaléine. Pour ce faire quelques grammes de poudre chaude (poudre calciné à 1000°C durant 15 h et gardée à 400°C) sont immergés dans une solution de phénolphtaléine. Si la solution vire au rose, alors la poudre contient de la chaux.

La composition de la poudre, c'est-à-dire le rapport molaire Ca/P, est déterminée par caractérisation qualitative par DRX. Les diffractogrammes sont réalisés avec un pas en 2θ de 0,02° et un temps de comptage de 4 secondes sur un intervalle de 27 à 38° afin de couvrir l'ensemble des pics de diffraction nécessaires à une possible quantification des phases secondaires (β -TCP ou CaO). Après identification des phases sur le diffractogramme de la poudre calcinée à 1000°C pendant 15h [Afnor'08], le rapport molaire Ca/P des poudres cristallisées est calculé à partir des intensités

intégrées des pics de diffraction (logiciel TOPAS). Les abaques utilisés dans cette méthode ont été réalisés et validés pour des poudres dont le rapport molaire Ca/P est compris entre 1,5 et 2,0 par Sylvie Raynaud [Raynaud'01] et inférieurs 1,5 par Arnaud Destainville [Destainville'03].

Préparation et caractérisation du lot d'hydroxyapatite

Après vérification de la conformité de chaque synthèse, les hydroxyapatites stœchiométriques ont été rassemblées pour former un lot de poudre. Les analyses qualitatives et quantitatives réalisées sur un échantillon du lot de poudre après calcination à 1000° durant 15 h montrent que le lot est composé à plus de 95% massique d'hydroxyapatite (figure A-2). En effet, une légère trace de β -TCP est observée ce qui conduit à un rapport Ca/P molaire égal à 1,662.

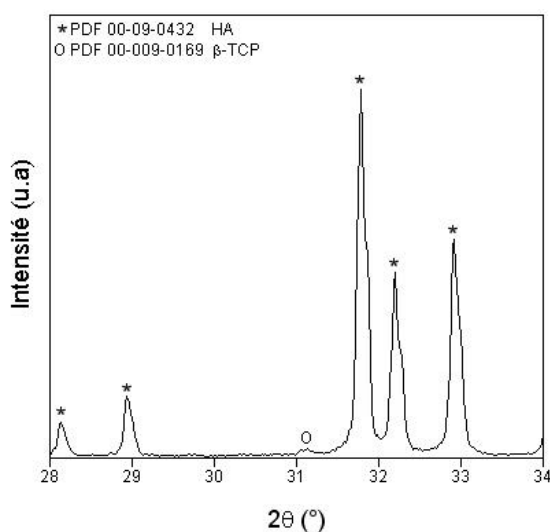


Figure A-2- Diffractogramme réalisé sur un échantillon du lot de poudre d'HA après calcination à 1000°C durant 15h

Ce lot a été broyé à l'aide d'un granulateur oscillant (Erweka AR 400 type FGS-grille 315 μ m) puis calciné à 650°C pendant 30 minutes afin de diminuer la surface spécifique de la poudre et de la préparer pour le procédé de granulation. Ce lot de poudre a ensuite été caractérisé par diffraction des rayons-X (figure A-3-a) et spectroscopie FT-IR (figure A-3-b). La poudre d'hydroxyapatite calcinée à 650°C est une poudre partiellement cristallisée contenant une légère trace de β -TCP. Une légère trace d'eau adsorbée est visible sur le spectre FT-IR mais aucun résidu de synthèse n'a été observé. La surface spécifique du lot de poudre d'hydroxyapatite a été mesurée par adsorption d'azote suivant la méthode BET [Emmett'37] et la distribution granulométrique de la poudre par granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) en voie sèche. Cette poudre a une surface spécifique de 34 m².g⁻¹, avec une distribution granulométrique multimodale (figure A-4). Le $d_{0,5}$ est estimé à 10 μ m.

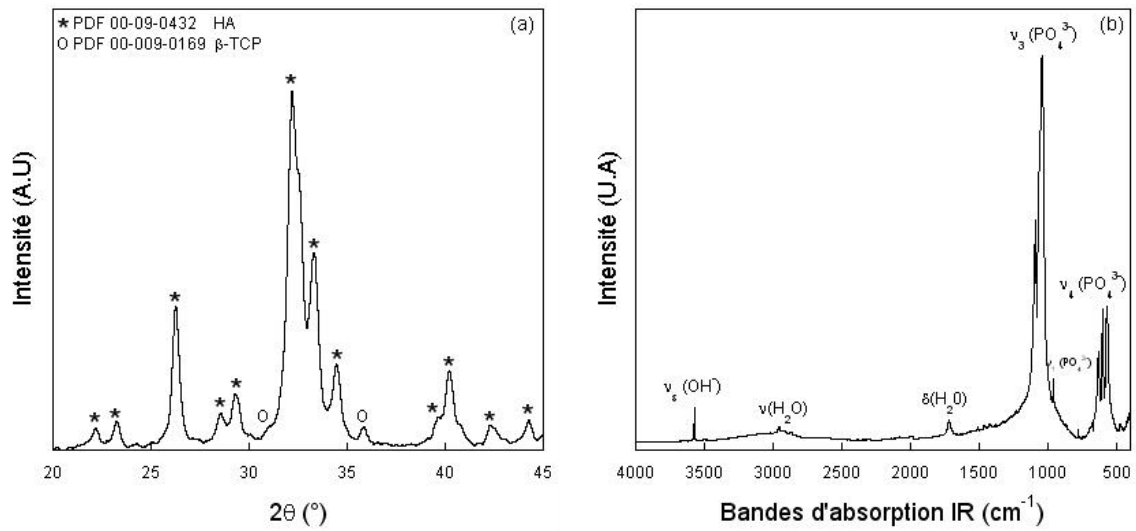


Figure A-3- (a) Diffractogramme et (b) spectre FT-IR du lot d'hydroxyapatite synthétisée et calcinée à 650°C durant 30 minutes

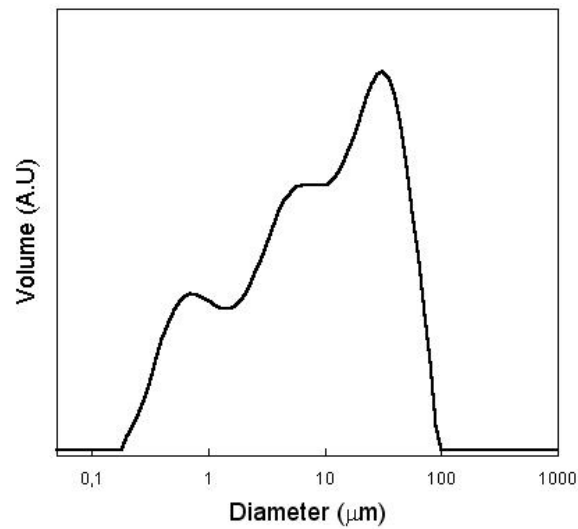


Figure A-4- Répartition en volume du lot d'hydroxyapatite synthétisée et calcinée à 650°C durant 30 minutes

Annexe 2

Caractéristiques du phosphate de calcium commercial

La caractérisation de la poudre commerciale de phosphate de calcium (Cooper – France- N° de lot 05110196/B) par diffraction des rayons-X montre que cette poudre est composée de deux phases cristallines : l'hydroxyapatite et la monétite (CaHPO_4 – phosphate dicalcique anhydre) (figure A-4-a). Le spectre FT-IR indexé de la poudre est présenté par la figure A-4-b. Cette poudre a une surface spécifique de $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et une distribution granulométrique multimodale (Figure A-5) avec un $d_{0,5}$ (μm) estimé à 9.

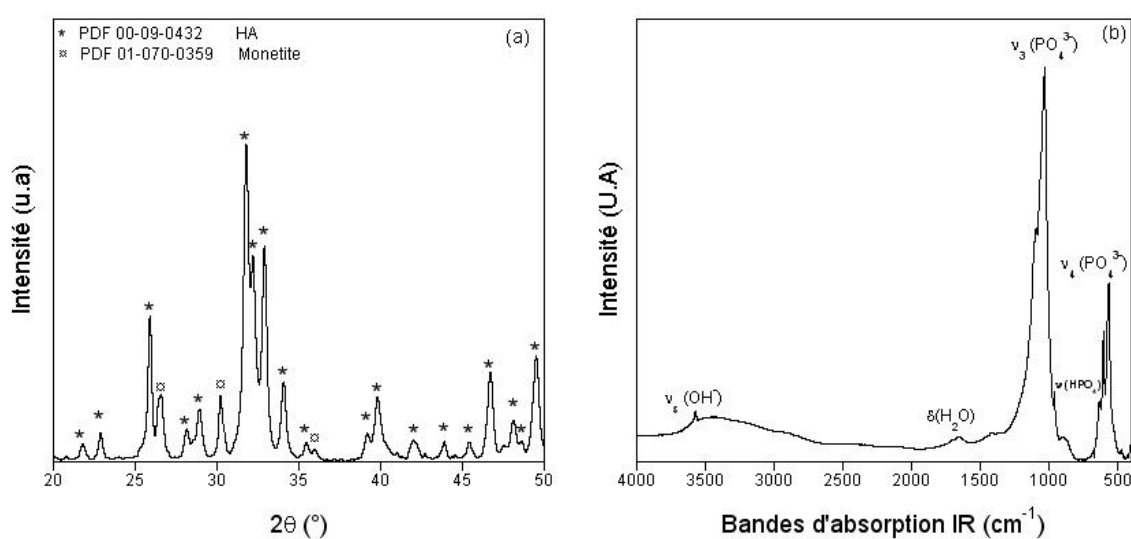


Figure A-4- (a) Diffractogramme et (b) spectre FT-IR du lot de poudre commerciale de phosphate tricalcique avant traitement thermique

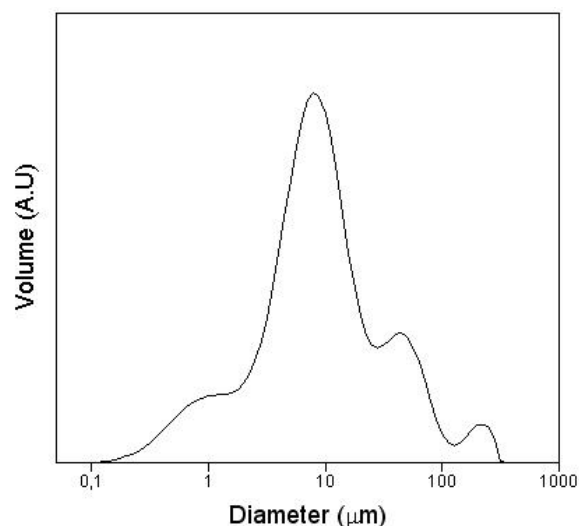


Figure A-5- Répartition en volume de la poudre commerciale de phosphate tricalcique avant traitement thermique

Les analyses qualitatives et quantitatives [Afnor'08] par DRX, réalisées sur un échantillon du lot de poudre après calcination à 1000° durant 15 h montrent que le lot est composé à plus de 95% massique de β -TCP (figure A-6). En effet, une légère trace de HA est observée ce qui conduit à un rapport Ca/P molaire égal à 1,512.

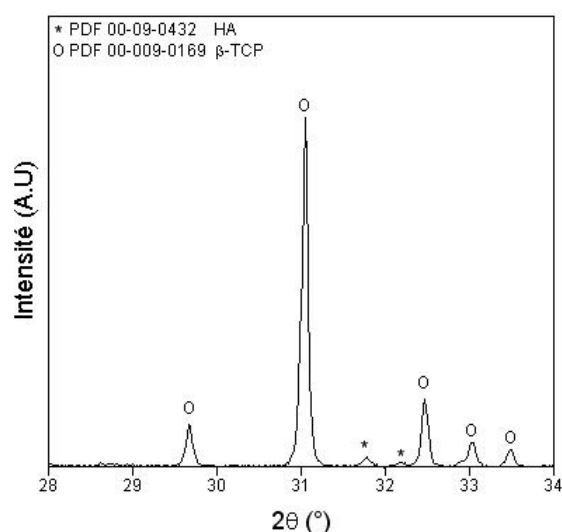


Figure A-6- Diffractogramme de la poudre commerciale de phosphate tricalcique après calcination à 1000°C durant 15h

Afin d'obtenir un produit monophasé avant la mise en forme de la poudre, deux traitements thermiques (700 et 900°C pendant 15 minutes) ont été appliqués à la poudre commerciale [Chevalier'09]. Les diffractogrammes (Figure A-7) montrent que le produit calciné à 700°C est composé d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique alpha (α -TCP) alors que celui calciné à 900°C est composé majoritairement de β -TCP avec des traces résiduelles d'hydroxyapatite. L'apparition successive des phases de phosphate tricalcique alpha et beta est due à une réaction solide/solide

entre les phases initiales, soit l'hydroxyapatite et la monétite. Tampieri *et al.* ont utilisé les mêmes précurseurs, *i.e.* un phosphate dicalcique anhydre et une hydroxyapatite stœchiométrique, pour la fabrication de biocéramiques de β -TCP par réaction solide/solide à haute température. D'après leur étude sur les transformations de phases d'un tel système, le phosphate tricalcique alpha formé à basse température (noté $\bar{\alpha}$ -TCP) commence à apparaître à partir de 700°C. L'augmentation de la température de calcination résulte en la formation de la phase stable du β -TCP [Tampieri'97]. Ils en ont déduit que la réaction en voie solide entre la monétite et l'hydroxyapatite peut être divisée en deux domaines de température : si $T \leq 750^\circ\text{C}$ il y a formation d'HA, phase majoritaire, avec $\bar{\alpha}$ -TCP comme phase stable et si $800^\circ\text{C} \leq T \leq 960^\circ\text{C}$ c'est la phase β -TCP qui est majoritaire.

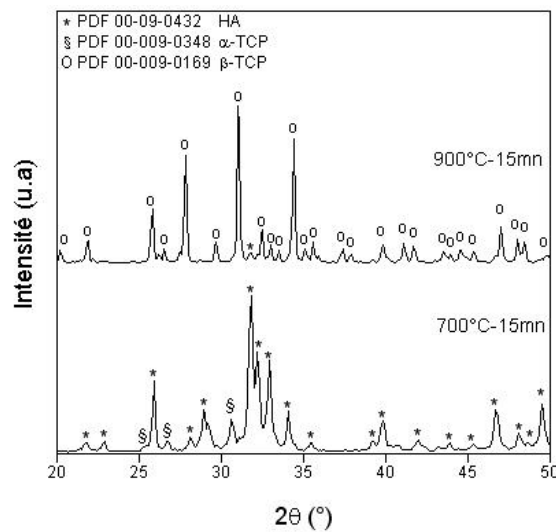


Figure A-7- Diffractogrammes des sphéroïdes calcinés à 700°C et à 900°C durant 15 minutes

Références

- [AFNOR'08] - AFNOR, Implants chirurgicaux — Hydroxyapatite Partie 3: Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase, 2008.
- [Chevalier'09] - Chevalier E, Viana M, Pouget C, Cazalbou S, Champion E, Chulia D. From porous pellets fabrication to drug loading and release: the case of calcium phosphate matrix loaded with ibuprofen. In: Safford M.P.& Haines J.G editors. Bioceramics : Properties, Preparation and Applications in follicular lymphoma and other cancer research: Nova Sciences Publishers; 2009
- [Destainville'03] - Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D and Laborde E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. Materials Chemistry and Physics 80(1):269-277,2003
- [Raynaud'01] - Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D and Laval JP. Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry. 2001. Journal of the American Ceramic Society;84:359-66
- [Raynaud'02] - Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D and Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. 2002. Biomaterials;23:1065-72
- [Tampieri'97] - Tampieri A, Celotti G, Szontagh F and Landi E. Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity. 1997. Journal of Materials Science: Materials in Medicine;8:29-37

RESUME

Les céramiques phosphocalciques, utilisées en chirurgie orthopédique en tant que substituts osseux, sont biocompatibles, bioactives, biorésorbables et osteoconductrices. L'intégration d'un réseau de pores dans ces substituts osseux accroît l'ostéointégration en favorisant l'invasion du support par les fluides biologiques et les cellules osseuses. Ces biocéramiques poreuses peuvent, après fonctionnalisation thérapeutique, être utilisées comme système de délivrance d'une molécule active (*Drug Delivery System*),. Le réseau de pores sert alors de réservoir au principe actif, permettant sa libération *in situ* et une réduction des effets secondaires par rapport à une administration par voie orale ou parentérale.

L'objectif de ce travail est la réalisation et l'étude d'un système de délivrance constitué de sphéroïdes phosphocalciques poreux d'hydroxyapatite (HA) ou de phosphate tricalcique beta (β -TCP) fonctionnalisés par de l'ibuprofène, pour un traitement *in situ* de pathologies inflammatoires osseuses. Le chargement de l'ibuprofène est réalisé par imprégnation en solution. Afin d'étudier les mécanismes de l'adsorption, la localisation et la quantité de principe actif adsorbé, ainsi que les cinétiques de dissolution *in vitro*, plusieurs méthodes de caractérisation sont mises en œuvre. Il est montré que le mécanisme d'adsorption est indépendant des caractéristiques physico-chimiques des sphéroïdes et des conditions d'imprégnation mais que la quantité adsorbée est fortement liée à la texture poreuse des sphéroïdes et à la nature du solvant d'imprégnation. Les essais de dissolution *in vitro* de l'ibuprofène dans un tampon phosphate à 37°C montrent que la libération de l'ibuprofène est rapide, indépendante de la composition chimique et des paramètres texturaux des grains, mais dépendante de la taille des sphéroïdes et de la répartition de l'ibuprofène sur les supports. Le relargage est plus rapide pour les grains de petite dimension et lorsque l'ibuprofène est adsorbé majoritairement sur la surface externe des sphéroïdes.

Mots-clés : *Système de délivrance, phosphates de calcium, ibuprofène, biocéramique, fonctionnalisation thérapeutique*

ABSTRACT

Calcium phosphate ceramics used as bone defect filler materials are biocompatible, bioactive, bioresorbable and osteoconductor. The presence of an interconnected pore network inside these bioceramics favors the attachment of bone cells and circulation of biological fluids. After being functionalized by therapeutic agents, these porous bioceramics can also be used as drug carriers in Drug Delivery Systems (*Drug Delivery System*). Indeed, the pore network play the role of therapeutic agent reservoir, allowing an *in situ* drug release which can reduce drug administration side effects compared to oral or parenteral administration.

The present work investigates the combination of calcium phosphate porous pellets with ibuprofen, an anti-inflammatory agent, for bone filling and treatment of inflammatory pathologies. Two calcium phosphate compositions, hydroxyapatite (HA) and beta tricalcium phosphate (β -TCP) were chosen to be formed by wet high shear granulation method and they were loaded by ibuprofen *via* impregnation. In order to study the drug adsorption mechanisms, its localisation, the pellets drug content and the *in vitro* drug dissolution kinetics, several characterisation methods were used. The obtained results showed that the adsorption mechanism of ibuprofen on the porous pellets is independent from their physicochemical properties and the impregnation parameters. However, the adsorbed amount of the drug depends strongly on the textural properties of the pellets and the impregnation solvent. The *in vitro* dissolution kinetics trials in a phosphate buffer at 37°C shows the independence of release kinetics from the pellets chemical composition and texture but it depends on the pellets size. Besides, the dissolution kinetics are influenced by the ibuprofen distribution on outer surface and inside the pores.

Keywords: *Drug Delivery System, calcium phosphate, ibuprofen, bioceramics, therapeutic functionalisation*