



UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTÉ DE MEDECINE

Année 1996

Thèse n° 72 / 1

ELABORATION D'UN CIMENT
OSSEUX PHOSPHOCALCIQUE

ESSAIS PRELIMINAIRES
AVENIR



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 22 novembre 1996

par

NATHALIE DROUINEAU

née le 1er octobre 1967 à Saumur (Maine et Loire)

EXAMINATEURS DE LA THESE :

M. le Professeur ARNAUD	Président
M. le Professeur PECOUT	Juge
Melle le Professeur DELAGE	Juge
M. le Professeur MOULIES	Juge
M. le Professeur MABIT	Juge
M. le Docteur CHARISSOUX	Membre invité
M. le Docteur SETTON	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTÉ DE MEDECINE

Année 1996

Thèse n° 172

**ELABORATION D'UN CIMENT
OSSEUX PHOSPHOCALCIQUE**

ESSAIS PRELIMINAIRES
AVENIR



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 22 novembre 1996

par

NATHALIE DROUINEAU

née le 1er octobre 1967 à Saumur (Maine et Loire)

EXAMINATEURS DE LA THESE :

M. le Professeur ARNAUD	Président
M. le Professeur PECOUT	Juge
Melle le Professeur DELAGE	Juge
M. le Professeur MOULIES	Juge
M. le Professeur MABIT	Juge
M. le Docteur CHARISSOUX	Membre invité
M. le Docteur SETTON	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE B
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIOSTATISTIQUE ET INFORMATIQUE MEDICALE
BRETON Jean-Christian (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CAIX Michel	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert (C.S)	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François	ANATOMIE PATHOLOGIQUE

A notre Maître et Président de Thèse

Monsieur J.P. ARNAUD

- **Professeur des Universités de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique**
- **Chirurgien des Hôpitaux**
- **Chef de service,**

Nous sommes fière de compter parmi vos élèves, et sur terre, et sur mer...

“Pani Problem, My Friend” , Vive les “Cuba Libre” !!!

Nous vous remercions d’avoir accepté de diriger ce travail,

Veillez y trouver l’expression de ma plus profonde admiration et de mon respect.

A notre Maître

Monsieur C. PECOUT

- **Professeur des Universités de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique**
- **Chirurgien des Hôpitaux**
- **Chef de service,**

Vous voir opérer est toujours magique et semble si facile !

Merci de m'avoir accueillie en orthopédie et d'avoir accepté de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de mon admiration.

2 Bis

A

Mademoiselle C. DELAGE

- Professeur des Universités de Chimie physique et Minérale

Monsieur le Professeur Arnaud vous remercie de votre présence au sein de ce jury.

A notre Maître

Monsieur D. MOULIES

- **Professeur des Universités de Chirurgie Infantile**
- **Chirurgien des Hôpitaux,**

Votre joie d'opérer ainsi que vos connaissances sont pour nous un exemple.

Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Veillez y trouver l'expression de mon profond respect et de mon admiration.

A notre Maître

Monsieur C. MABIT

- **Professeur des Universités d'Anatomie**
- **Chirurgien des Hôpitaux,**

Votre perfectionnisme et votre rigueur sont un exemple pour nous tous.

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger cette thèse.

Veillez trouver ici un témoignage de mon respect.

Au Docteur

Monsieur J.L. CHARISSOUX

Votre honnêteté, votre sens de l'autocritique, vos qualités chirurgicales ont toujours suscité notre admiration.

Veillez trouver dans ce travail un témoignage de mon respect.

Au Docteur

Monsieur D. SETTON

Contre Vents et Marées,
La "Puce" est devenue grande....

A un Ami.

A Madame Leboutet,

Pour sa gentillesse, son aide pour la partie "histologique" de ce travail.

Au Personnel des Services où j'ai sévi,

Travailler dans la confiance et la bonne humeur est un plaisir et permet de faire face à de nombreuses situations!

Je tiens à remercier **la société MIL** pour sa contribution à ce travail,

Le laboratoire **de Chimie Physique et Minérale**, Faculté de Pharmacie à
Limoges,

Ainsi que Christophe Cueille, qui a eu la patience et la gentillesse de
m'apprendre la navigation à travers les pics de diffraction X !

A François,

A mes Parents,

A Caroline, ma soeur,

A ma Famille,

A la "Famille" Orsoni,

A mes Amis

*“...Et dans c’ bouquin y a écrit
Que des gars s’la coulent douce à Miami
Pendant c’temps que je fais l’zouave
Au fond d’la cave
Paraît qu’y a pas d’sot métier...”*

S. GAINSBORG

10
PLAN

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES RESINES ACRYLIQUES

II. LES GREFFES OSSEUSES

1. Historique
2. Les différents types de greffe osseuse
3. Les substituts

III. LES CIMENTS OSSEUX PHOSPHOCALCIQUES

1. Introduction
2. Ciments à base de phosphate tétracalcique
3. Ciments à base de β phosphate tricalcique
4. Ciments à base de α phosphate tricalcique
5. Ciments à base de verres bioactifs

ETUDE EXPERIMENTALE

A . INTRODUCTION

B . MATERIEL ET METHODES

I. FORMULATION

II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

1. Constituants minéraux de départ
2. Produit fini : le COPC
 - 2.1. Analyse en microscopie électronique à balayage
 - 2.2. Analyse par diffraction X

III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES

IV. ETUDE BIOLOGIQUE

1. Etudes *in vitro* de la cytotoxicité
 - 1.1. Contacts d'extraits
 - 1.1.1. Milieu de culture des macrophages

- 1.1.2. Mode de prélèvement des macrophages
- 1.1.3. Protocole opératoire
- 1.2. Contact direct
 - 1.2.1. Milieu de culture et prélèvement des macrophages
 - 1.2.2. Protocole opératoire
- 2. Etudes *in vivo*
 - 2.1. Essais immunotoxicologiques
 - 2.1.1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC
 - 2.1.2. Recherche des signes d'intolérance au COPC
 - 2.1.3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC
 - 2.2. Implantations chez l'animal
 - 2.2.1. Implantations en intramusculaire
 - 2.2.2. Implantations en intraosseux

C . RESULTATS

I. FORMULATION

II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

- 1. Constituants minéraux de départ
- 2. Produit fini : le COPC
 - 2.1. Analyse en microscopie électronique à balayage
 - 2.2. Analyse par diffraction X

III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES

IV. ETUDE BIOLOGIQUE

- 1. Etudes *in vitro* de la cytotoxicité
 - 1.1. Contacts d'extraits
 - 1.2. Contact direct
- 2. Etudes *in vivo*
 - 2.1. Essais immunotoxicologiques
 - 2.1.1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC
 - 2.1.2. Recherche des signes d'intolérance au COPC
 - 2.1.3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC
 - 2.2. Implantations chez l'animal
 - 2.2.1. Implantations en intramusculaire
 - 2.2.2. Implantations en intraosseux

D . DISCUSSION

I. FORMULATION ET ETUDE PHYSICOCHIMIQUE

II. EVALUATION BIOLOGIQUE

E . CONCLUSION

AVENIR : quelles sont les applications biomédicales envisageables pour les ciments osseux phosphocalciques?

I. LE CIMENTAGE DES PROTHESES SANS CIMENT

II. LA REPARATION OSSEUSE EN TRAUMATOLOGIE

III. UNE ALTERNATIVE À LA GREFFE

IV. GREFFE EXPENDER

V. VECTEUR DE PRINCIPES ACTIFS

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

PRINCIPALES ABREVIATIONS

AAA : allogenic autolysed antigen extracted bone

BMPs : bone morphogenic (morphogenetic) protein

CC : carbonate de calcium

COPC : ciment osseux phosphocalcique

CPC : calcium phosphate cement

DCPA : phosphate dicalcique anhydre

DCPD : phosphate dicalcique dihydrate

DNA : acide desoxyribonucléique

FGF : fibroblast growth factor

HAp : hydroxyapatite

IGF : insulin growth factor

MCPM : phosphate monocalcique monohydrate

MPa : méga Pascal

PDGF : platelet derived growth factor

PEHD : polyéthylène haute densité

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

PVC : polychlorure de vinyle

SRS : skeletal repair system

TCP : phosphate tricalcique

TGF β : transforming growth factor β

INTRODUCTION

Quotidiennement les chirurgiens orthopédistes utilisent des matériaux pour réaliser des comblements osseux, cimenter des implants. Parmi les produits mis à notre disposition, nous utilisons principalement les résines acryliques pour poser les prothèses. Les défauts osseux sont, quant à eux, comblés par des greffes, parfois des substituts d'os comme les céramiques phosphocalciques, le polyméthacrylate de méthyle.

Ces produits n'apportent pas totale satisfaction. Une des voies de recherche est représentée par l'étude des ciments biorésorbables de type phosphocalcique.

La première partie de ce travail consiste en une étude bibliographique en trois chapitres : les résines acryliques (le polyméthacrylate de méthyle), les greffes osseuses et les facteurs de croissance de l'os, les substituts de greffes osseuses et notamment les ciments biorésorbables.

Dans une deuxième partie, nous exposerons la démarche expérimentale qui nous a mené à mettre au point et tester un nouveau ciment à os de type phosphocalcique.

Une troisième partie sera consacrée à une réflexion sur les applications cliniques possibles des ciments biorésorbables.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES RESINES ACRYLIQUES

Les ciments osseux couramment utilisés en chirurgie orthopédique sont des résines acryliques dérivées du PMMA [74].

Ils sont utilisés pour :

- fixer des biomatériaux,
- remplir des défauts osseux,
- délivrer des substances actives telles que des antibiotiques[8] .

Le rôle du PMMA en chirurgie prothétique est d'adapter les différentes surfaces des implants à leur contenant : l'os [93]. Il participe à la stabilisation immédiate de la prothèse plutôt que de réaliser un véritable cimentage [40]. Les résines acryliques permettent la transmission des forces appliquées sur la prothèse qui est métallique (et donc rigide) aux structures osseuses plus élastiques : elles jouent le rôle d'un amortisseur.

Les études des premières prothèses posées montrent un fort taux de descellement. Les chirurgiens ont donc tenté d'améliorer le procédé de cimentation pour améliorer la qualité du cimentage. Actuellement les résines sont injectées avec un obturateur diaphysaire, sous pression ; le ciment doit être homogène et liquide.

Néanmoins l'utilisation d'une résine acrylique n'est pas dénuée de risques.

Le PMMA a un potentiel immédiatement toxique : une partie du monomère peut être relarguée dans la circulation générale et peut provoquer des phénomènes d'intolérance allant de l'insuffisance rénale à l'hypotension artérielle et l'arrêt cardiaque [40].

La polymérisation de la résine est une réaction fortement exothermique. La chaleur entraîne la mort des ostéocytes sur une épaisseur qui pourrait atteindre 3 mm [58]. La zone nécrosée est progressivement remplacée par une fine couche d'interposition conjonctive [40] : le PMMA ne se lie jamais directement à l'os.

A moyen terme, cette membrane provoque, pérennise et accentue une micromobilité : on rentre dans un cercle vicieux qui aboutit au descellement.

Le ciment évolue avec le temps : à long terme il devient de plus en plus dur et cassant sous l'effet de contraintes alternées[47]. Il libère alors des particules qui sont phagocytées par les macrophages. Les granulomes ainsi formés constituent des géodes : l'os est érodé, "rongé de l'intérieur" [40] [97]. La biocompatibilité médiocre des particules de fragmentation des résines acryliques aurait alors un rôle majeur dans le descellement [47].

Les fragments de résine peuvent migrer dans l'articulation ; ils sont abrasifs pour le polyéthylène (qui s'use aussi à cause du couple de frottement) [60].

De même que les particules de ciment, les particules de polyéthylène sont prises en charge par le système macrophagique. Les macrophages activés produisent des cytokines qui sont responsables de l'ostéolyse [33].

Pour d'autres auteurs [44], la corrosion des métaux provoque elle aussi une réaction granulomateuse macrophagique locale (la corrosion de fils de trochantérotomie provoque une ostéolyse métaphysaire).

Stauffer [75] a étudié les signes de descellement (migration ou liseré autour des composants) de 333 arthroplasties de hanche posées entre 1969 et 1970 à la MAYO CLINIC. Elles ont été revues jusqu'en 1982. A 5 ans, 6,5 % des cupules et 24 % des fémurs présentent des signes de descellement. Ces chiffres montent respectivement à 11,3 et 29,9 % à 10 ans. Le taux de reprises chirurgicales à 5 ans est de 3 % et à 10 ans de 7,4 % . Ces chiffres se sont actuellement certainement modifiés compte tenu de l'amélioration des techniques d'implantation.

Garcia-Cimbrelo [26] a mené une étude similaire sur 680 prothèses totales de hanche posées entre 1971 et 1979 avec un recul de 18 ans. Il note 19 % de descellement des implants cotyloïdiens. Ces chiffres permettent d'évaluer les incidences humaines et économiques des descellements d'implants.

Pour allonger la durée de vie des prothèses totales de hanche, on a tenté d'en améliorer l'ancrage :

- en diminuant la chaleur produite par la polymérisation,
- en améliorant l'élasticité du ciment,
- en améliorant la résistance du ciment par l'adjonction de particules métalliques (Taitzman et Saha), de fibres de carbone (Robinson, Knoell), de fibres de polymères (Wright, Pourdeyhimi),
- en greffant sur le PMMA ou d'autres polymères des apatites modifiées pour rendre ce ciment bioactif (Dandurand, Saito),
- en recherchant un ciment biodégradable et réhabitable par l'os.

D'autres équipes ont mis au point des prothèses à ancrage biologique. Le principe est de permettre un contact intime sans interposition de corps étranger entre l'os et la prothèse. Les premières prothèses avaient une surface poreuse pour permettre la croissance de l'os dans les anfractuosités du métal. Ce sont les prothèses de type pométal de Judet, madréporeuse de Lord, en alumine de Boutin. Les premières prothèses furent un échec.

Le dessin de l'implant fémoral ne respectant pas l'anatomie, on a vu apparaître des fractures de la corticale antérieure du fémur par phénomène de "stress shielding cortical atrophy" [47]. Les revêtements macroporeux étaient autant de points d'appel à la corrosion.

Actuellement les implants fémoraux ont une forme anatomique et ils sont recouverts de revêtements bioactifs de type hydroxyapatite permettant une liaison intime entre l'os et l'apatite. Pour poser ces prothèses, l'adaptation entre le fût et l'implant doit être parfaite, on doit obtenir une excellente stabilité primaire[73]. Malgré tout le soin apporté à la préparation du fémur, il peut exister des micromobilités entre le fût et l'implant, source de douleurs et préjudiciable à la réhabilitation.

Malgré tout, le PMMA reste encore largement utilisé.

II- LES GREFFES OSSEUSES

1- Historique

Elles se sont développées dans la première moitié du XX^{ème} siècle. Mais la première greffe réalisée est attribuée à Philipp Von Walther en 1820 [80].

Parallèlement, les chirurgiens ont réalisé des recherches pour tenter de comprendre les mécanismes de l'ostéogenèse et de la réparation osseuse.

Duhamel en 1739 [11] a débuté les recherches sur l'ostéogenèse : après avoir posé des cercles de fil d'argent en sous-périoste, il les retrouve quelques semaines plus tard recouverts d'os. Pour Duhamel, ce nouvel os est produit par les propriétés ostéogéniques du périoste. De 1836 à 1893, on croit que l'os greffé reste vivant et que le périoste est nécessaire à l'ostéogenèse [17].

Von Haller, en 1763, croit que la guérison des fractures est secondaire à l'exsudation de substances à partir des vaisseaux sanguins du périoste.

C'est à Ollier (1858) que l'on doit la première approche scientifique à partir de la chirurgie aseptique et des méthodes histologiques. D'après une expérience de 1867 menée chez le lapin, il déduit que l'os et le périoste transplantés (ou plutôt greffés) ont des capacités à être ostéogéniques.

Pour Haxhausen (1907), le périoste greffé survit et conserve une bonne activité ostéogénique dans les autogreffes. Cette activité est beaucoup moindre dans les hétérogreffes et quasiment nulle dans les xénogreffes. Il croit que tout os greffé meurt mais que la plupart du périoste survit et est la source de l'ostéogenèse.

Macewen a réalisé la première allogreffe osseuse chez un enfant en 1878. Pour lui, le périoste par lui-même ne peut former d'os mais il agit comme une membrane limitante apportant des éléments nutritifs.

Par la suite, les autogreffes deviennent rapidement d'utilisation courante au début du XX^{ème} siècle. Les allogreffes restent longtemps occasionnelles et leurs résultats sont difficiles à analyser en dépit de l'existence d'observations ponctuelles spectaculaires. En 1920, Albee publie une série de 1600 autogreffes réalisées avec succès.

Les premiers travaux sur la conservation d'os ont débuté en 1910 avec Bauer. De l'os homologue peut être conservé par réfrigération pendant 3 semaines et puis greffé avec succès chez le chien. Par la suite Tuffier (1911), Albee (1912), Smith (1937) ont poursuivi ces travaux.

L'utilisation des allogreffes prendra son essor grâce à la création des premières banques à os d'après les travaux de Bush et Wilson en 1947. Vingt ans plus tard, les résultats de séries d'allogreffes massives sont publiés permettant de confirmer leur intérêt et de dévoiler leurs inconvénients notamment les complications infectieuses. Des progrès ultérieurs sont réalisés en augmentant la rigueur des protocoles pour la stérilité des greffes [80]. Ce sujet reste néanmoins encore d'actualité avec les risques de contamination par les prions.

Parallèlement au développement des greffes osseuses, des recherches sur l'ostéogénèse se poursuivent. Levander en 1934, Annersten en 1939, Lacroix en 1947, Hartley-Tanzet et Schneider en 1947 étudient les effets de l'injection d'émulsions et d'extraits d'os et de périoste pour tenter d'isoler une substance organique qui stimulerait l'ostéogénèse. Certains de ces auteurs injectent ces extraits en position hétérotopique .

En 1930, Levander injecte des extraits alcooliques grossiers d'os en intra-musculaire et cela provoque la formation d'os [15]. Cette expérience est confirmée par Willestadt en 1950. Lacroix en 1943 appelle ostéogénine une substance qui, extraite de l'os par l'action d'alcool et d'acide, entraîne chez le lapin la production hétérotopique d'os.

Mais la première démonstration certaine de formation osseuse a été décrite par Urist en 1965 [84]. Il implante en position intra-musculaire de la matrice osseuse décalcifiée à l'acide et observe une formation d'os.

Pour Urist [84], l'os décalcifié par l'acide est un excellent substitut de greffe osseuse qui possède une compétence ostéogénique [17]. La matrice décalcifiée est envahie par des néovaisseaux sanguins, elle est résorbée rapidement et du nouvel os est déposé. Les cellules ostéoprogénitrices ne sont pas issues du tissu donneur mais de la prolifération des cellules mésenchymateuses périvasculaires pluripotentes du receveur. La séquence d'induction produit entièrement, par une ossification de type enchondral, un os mature avec une cavité médullaire. Par rapport à une autogreffe, le taux de formation osseuse et de remodelage est supérieur à des termes plus précoces.

Par technique chromatographique, Urist isolera un facteur ostéinductif qu'il appellera Bone Morphogenetic Protein ou BMP [17]. Les analyses ultérieures ont montré qu'il s'agit en fait de plusieurs protéines distinctes qui, seules ou en association avec d'autres molécules régulatrices, induisent la formation d'os. Maintenant il est admis que l'ostéoinduction est contrôlée par des protéines matricielles osseuses [17]. Elles peuvent être extraites de la matrice osseuse des mammifères ou produites par des cellules issues de sarcomes ostéogéniques.

Progressivement sous ce terme générique de BMP, on a pu isoler 7 protéines notées de 1 à 7.

Les BMP de 2 à 7 appartiennent à la superfamille du TGF β [55] .

Il existe de nombreux facteurs de croissance stockés dans la matrice osseuse (IGF, TGF β , PDGF, FGF, BMP, facteurs de croissance hématopoïétiques) mais en faible quantité.

Ces facteurs interagissent entre eux comme l'a démontré Urist en 1983 [85] : la production et la régénération d'os sont attribuables à la coaction entre la BMP et les facteurs de croissance dérivés de l'os (Bone Growth Derived Factors - BDGF). La BMP initie et les BDGF stimulent les autres stades du développement osseux.

Wozney en 1989 a codé la séquence de cDNA des BMP et permis depuis le développement des protéines recombinantes sans risques de transmission infectieuse. Actuellement des recherches sont en cours pour déterminer quel est le meilleur vecteur pour l'utilisation des BMP.

2- Les différents types de greffes osseuses

Idéalement les greffes osseuses doivent apporter trois composants distincts nécessaires pour la régénération osseuse [30] : une matrice ostéoconductive qui sert de "tremplin environnemental", des cellules ostéogéniques, et des facteurs ostéoinductifs qui stimulent les ostéoblastes dormants pour participer au processus de réparation.

Ces sont les autogreffes qui, possédant ces trois éléments sont les meilleures greffes. Mais elles ont plusieurs désavantages : la morbidité due au prélèvement, un stock limité.

Les complications au site donneur sont variées : spoliation sanguine, sepsis, douleurs, anesthésie, instabilité pelvienne, fractures de fatigue, hernie iliaque, fistule, blessure de l'urètre, ossifications hétérotopiques [17]. Pour Younger et Chapman ces prélèvements entraînent 8,6 % de complications majeures, 20,6 % de complications mineures. D'après Summers et Eisenstein il existe 25 % de douleurs persistantes au niveau de la crête iliaque [29].

Des formes variées de greffes allogéniques fraîches, congelées, lyophilisées, déminéralisées sont couramment utilisées. Mais ces greffes n'ont qu'une pauvre compatibilité immunologique. Elles sont moins bien revascularisées et le taux de formation osseuse est plus faible que pour les autogreffes. Elles sont la source d'une résorption tardive ce qui entraîne des fractures de fatigue, le risque de transmission infectieuse est réel. Pour diminuer leur antigénicité, on utilise des procédés de congélation, lyophilisation et parfois on associe une suppression des antigènes et une déminéralisation (Allogenic Autolysed Antigen extracted Bone : AAA bone). Ces traitements altèrent les propriétés physiques du matériau.

Les xéno greffes sont hautement immunogènes et même considérées comme inefficaces du fait de leur antigénicité.

3- Les substituts

Pour tenter de pallier aux problèmes rencontrés lors de l'utilisation de greffes osseuses, se sont développés des substituts ostéoactifs [17]. On oppose deux méthodes pour le remplacement d'os [23]:

-la méthode ostéoconductive : le produit supporte la croissance des néocapillaires, des tissus périvasculaires, des cellules ostéoprogénitrices ; ces produits ne peuvent induire la production hétérotopique d'os, leur surface doit avoir des caractéristiques physiques et chimiques nécessaires à la fixation, la croissance et la division cellulaire. Ces produits sont les céramiques phosphocalciques, le phosphate tricalcique (TCP).

-la méthode ostéoinductive : elle permet la production d'os en position hétérotopique, elle supporte la mitose des cellules mésenchymateuses indifférenciées et les transforment en cellules productrices d'os.

Le premier substitut osseux a été le **Plâtre de Paris** utilisé par Dreesman depuis 1892. Les chirurgiens s'en sont servi pour remplir des cavités osseuses, seul ou combiné à du phénol ou d'autres antiseptiques pour traiter les cavités d'ostéomyélites et les tuberculoses osseuses. Edberg en 1930 conclue que la combinaison plâtre-antiseptique sert de support structurel pendant 2 à 3 semaines seulement. Après, il est complètement résorbé. Peltier en 1957 détermine que le plâtre ne stimule pas l'ostéogénèse mais plutôt agit comme une matrice ostéoconductive pour la croissance des vaisseaux. La régénération osseuse survient avec la résorption du plâtre.

Les **phosphates de calcium** et autres **céramiques** sont utilisés depuis 1920. Les premières implantations sont dues à Albee et Morisson dans les années 1920. Elles sont de deux types principaux : le Phosphate Tricalcique ou TCP et l'hydroxyapatite. Le TCP est une substance ostéoconductrice biocompatible qui est résorbée en quelques semaines. Quelques reliquats de matériau peuvent être observés des années après l'implantation, en association avec l'os néoformé. Malgré sa pauvre résistance mécanique qui est équivalente à celle de l'os spongieux, le TCP reste utilisé en chirurgie dentaire et maxillo-faciale. L'hydroxyapatite présente peu de résorption apparente. Le degré de résorption est fonction de la composition chimique, du degré de cristallinité, de la densité, de la microstructure et de l'environnement. Cette céramique est éminemment biocompatible et il existe une apposition directe d'os à son contact sans interposition de tissu fibreux.

L'hydroxyapatite est une substance ostéoconductive et sa réhabilitation par de l'os natif dépend de la porosité ouverte. Elle est utilisée en chirurgie dentaire pour réaliser des comblements. Après une utilisation large en orthopédie pour la reconstruction osseuse, son emploi est actuellement limité à peu d'indications du fait de son faible taux de résorption. Elle est plus utilisée sur des prothèses à surface bioactive avec implantation d'hydroxyapatite par projection plasma.

D'autres équipes utilisent des produits biphasiques à base de TCP et d'hydroxyapatite pour réaliser avec succès d'après leurs travaux des fusions vertébrales en association avec un matériel d'ostéosynthèse rigide.

Le **corail**, la **nacre**, des hydroxyapatites élaborées à partir de squelettes de corail ont également été utilisés.

De nouveaux substituts **composites** se développent. Il s'agit de mélanges à base de collagène purifié associé à des céramiques, ceci dans le but d'empêcher la migration des granules d'apatite. De même, l'hydroxyapatite a pu être mélangée à de la fibrine, du Plâtre de Paris, du PMMA.

Une étape suivante a été la découverte des **verres bioactifs** par Hench en 1970. Actuellement certaines équipes utilisent de tels verres associés à de l'apatite et de la wollastonite en chirurgie orthopédique en zone non portante.

Grâce aux recherches sur l'ostéogénèse, sont apparus les matériaux **ostéoinductifs**. La matrice osseuse déminéralisée est utilisée depuis Senn (1889). Les résultats sont meilleurs avec une matrice traitée à l'acide chlorhydrique. Actuellement cette matrice est utilisée sous forme de composite avec de la moelle osseuse autologue. Depuis quelques années, les BMP sont implantées avec différents vecteurs afin de stimuler l'ostéogénèse. Des études multicentriques sont en cours de réalisation.

Aucun de ces produits ne répond totalement à l'attente du chirurgien. D'autres auteurs ont étudié les ciments à os biorésorbables.

III- LES CIMENTS OSSEUX PHOSPHOCALCIQUES

1. Introduction

Les phosphates de calcium sont les constituants majeurs de la phase minérale du squelette des vertébrés. Dès 1926, De Jong [69] montrait en diffraction X que le minéral osseux présente des analogies avec les minéraux de type apatitiques.

Les apatites sont représentées par la formule chimique générale :



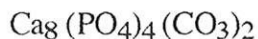
Me est un métal bivalent (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+})

XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-})

Y est un anion monovalent (F^- , Cl^- , OH^-).

Elles ont pour propriété de cristalliser dans le système hexagonal, de former des solutions solides et d'accepter un grand nombre de substituants. Elles sont très flexibles et tolèrent de grands écarts de stoechiométrie, ce qui fait qu'elles ont pu s'adapter à de nombreux tissus : os, dentine, écailles de poissons.

La plupart des apatites biologiques peuvent être définies comme des apatites phosphocalciques carbonatées de formule :



Les apatites osseuses jouent le rôle de réservoir d'ions minéraux (99 % des réserves de calcium et 85 % des réserves de phosphore). Elles stockent des éléments minéraux essentiels et des éléments traces.

Dans l'os, les apatites sont associées à une matrice organique collagénique et non collagénique de manière à constituer un matériau composite avec de grandes propriétés mécaniques : environ 150 MPa de résistance en compression et 100 MPa en flexion. Elles ont la capacité d'évoluer, en particulier en fonction de l'âge du sujet et des sollicitations mécaniques. Elles permettent l'adsorption des protéines ainsi que l'adhésion et l'expression des cellules ostéoblastiques.

De nombreuses équipes ont étudié les ciments phosphocalciques :

2. Ciments à base de phosphate tétracalcique

L'un des premiers ciments à base de phosphate de calcium a été mis au point par Brown et Chow [25] : le "calcium phosphate cement" (CPC). Gruninger [25] a introduit le premier le terme "ciment phosphocalcique".

La composition du CPC est la suivante :

Composant en poudre :

-phosphate tétracalcique : 72,9 %

-phosphate anhydre de calcium (DCPA) (ou dihydrate - DCPD) : 21,9 %

Phase liquide :

-solution aqueuse de H_3PO_4 (25 mM) et de NaF (1,32 mM).

-rapport poudre / liquide = 4 .

-rapport Ca / P = 1,5 environ.

La réaction est complète en 4 heures et produit de l'hydroxyapatite stoechiométrique.

Le temps de prise est compris entre 8 et 22 min.

La résistance en compression est mesurée entre 9 et 34 MPa.

3. Ciments à base de β phosphate tricalcique

Mirtchi et Lemaitre [45,53] ont élaboré un ciment à base de β phosphate tricalcique (β TCP) et de phosphate monohydrate de calcium (MCPM). Ces matériaux peuvent être solidifiés en solution acide. La résistance mécanique du système est le résultat de 2 processus : la cristallisation du DCPD qui est produit à partir du MCPM, et la dissolution partielle du β TCP qui tend à compenser l'acidification du système donné par l'hydrolyse du MCPM (pH = 5).

Mirtchi [53] a étudié les différentes granulométries des poudres initiales et il semble que le ciment le plus résistant soit obtenu pour des grains les plus gros, pour une température de fabrication du β TCP la plus basse et pour une concentration du MCPM qui représente 20% du poids total.

On assisterait à une dissolution du MCPM puis à une cristallisation progressive dans la pâte de DCPD qui établirait alors des ponts entre les molécules de β TCP .

Dans une atmosphère humide, la résistance mécanique de ce ciment diminue : les liaisons intermoléculaires du β TCP s'hydrolysent.

La résistance en compression de ce type de ciment est mesurée à 1 MPa.

Le "setting time" (temps de prise) peut être modifié par la présence de sulfate de calcium dihydrate, de sulfate de calcium hémihydrate, de pyrophosphate de calcium ; il passerait alors de 2 à 10 min.

4. Ciments à base de α phosphate tricalcique

Monma [56] a développé un ciment à base de α TCP et de DCPD. Le mélange de ces composés dans l'eau produit du phosphate octacalcique. Le rapport Ca / P est compris entre 1 et 1,5. Des études mécaniques ont montré que, après 24 heures de trempage dans un liquide biologique (non précisé dans la publication), la résistance du système augmente pour atteindre 17 MPa. Le "setting time" est compris entre 9 et 30 min.

Oonishi [63] utilise un mélange d' α TCP, de DCPD et de citrate de calcium qui donnerait un ciment très résistant en compression (90 à 130 MPa). Ce type de ciment pourrait permettre le cimentage d'implant prothétique.

Kurashina [43] a travaillé sur le système Monma ; il a pu en modifier le "setting time" à l'aide de succinate de sodium et rendre la pâte plus facilement "travaillable" avec du sulfate de chondroïtine. Le rapport poudre / liquide est de 3. Après séjour dans un fluide biologique, la résistance en compression de 10 à 20 MPa le premier jour, pour augmenter à 80 - 90 MPa au 7^{ème} Jour. Ces produits sont au stade d'évaluation clinique.

Les travaux de Constantz [13] sont menés d'après l'observation du corail qui, contrairement aux vertébrés, n'a pas besoin de protéines pour construire son exosquelette. Le ciment élaboré, le "Skeletal Repair System" (SRS), mime le corail par des réactions physico-chimiques contrôlées.

Constantz utilise un mélange de :

-MCPM ;

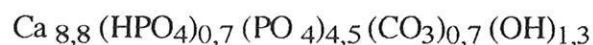
- α TCP ;

-carbonate de calcium (CC) .

Ce dernier composant en poudre est additionné à une solution tampon de phosphate de sodium.

Quand le calcium et le phosphore sont hydratés, ils libèrent des ions qui saturent le milieu et qui précipitent en une phase intermédiaire.

Le produit final est une hydroxyapatite carbonatée non stoechiométrique de formule :



La réaction se déroule à température ambiante et à pH physiologique (entre 7,4 et 7,8). Le temps de prise est d'environ 10 min. Le produit devient soluble quand le pH s'abaisse. En 30 min, le produit formé (la dahllite) atteint la moitié de sa résistance maximale qui est 55 MPa.

La dahllite n'induit ni réaction inflammatoire nocive, ni réaction immunologique. Sur des coupes histologiques, des ostéoclastes ont été vus résorbant le SRS. Une fois implanté, le SRS continue à se transformer en hydroxyapatite.

La résistance en compression est de 55 MPa et de 2,1 MPa en flexion.

Le rapport Ca / P = 1,67.

Selon le concepteur, les indications cliniques du SRS seraient les suivantes :

- remplissage des cavités et des défauts osseux ;
- restauration de la géométrie de l'os normal ;
- fixation interne en traumatologie dans le cas d'ostéopénie.

Bermúdez [1] étudie le système α TCP - DCPD dans une phase aqueuse après avoir testé la plupart des ciments présentés dans la littérature .

Le pH de la réaction est basique, la pâte la plus malléable est obtenue pour un ratio eau / poudre de 0,3. La résistance maximale en compression est retrouvée (pour un rapport Ca / P = $1,36 \pm 0,03$) égale à 30 ± 5 MPa. Le temps de prise est mesuré entre 10 et 30 min. Néanmoins ce type de ciment ne permet pas l'implantation de prothèses.

5. Ciments à base de verres bioactifs

Nishmura [58] a étudié les ciments orthophosphate de calcium développés à partir des verres bioactifs.

Les premiers verres bioactifs ont été créés par Hench en 1970 (Bioglass[®]).

Un verre (CaO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂) est pilé et dissous dans une solution de phosphate d'ammonium. Le temps de prise varie entre 4 et 7 min. La température de la réaction ne dépasse pas 30 °C. Dans l'eau, ce composé se transforme en hydroxyapatite en une semaine.

Ce type de produit est biocompatible mais induit une réaction inflammatoire. Celle-ci reste néanmoins négligeable comparée à celle provoquée par le PMMA. Il n'est pas observé de nécrose ni de dégénérescence des tissus adjacents.

Il se forme une mince couche de tissu fibreux en 4 semaines, mais celle-ci a disparu au bout de 24 semaines ; il existe une continuité entre le ciment et l'os lamellaire qui s'est déposé sur toute sa surface. On n'observe aucun signe de dégradation du ciment (ni résorption, ni fragmentation).

La résistance en compression est de 16 MPa. Après implantation de cylindres de ciment durcis dans les muscles des pattes postérieures du rat, la résistance en compression peut atteindre des valeurs de 68 MPa après 7 jours.

Kokubo [41] et Ono [62] ont réalisé un matériau composite : apatite- wollastonite et verre bioactif. La résistance mécanique de tels matériaux peut atteindre en milieu sec 200 MPa en flexion. Il existe une liaison biologique entre le verre et l'os natif : une couche d'apatite s'est formée en surface de l'implant à partir de la dissolution des ions calcium et silicate. Les ostéoblastes prolifèrent.

L'os périphérique vient donc directement en contact avec la céramique sans interposition de tissu fibreux.

Ces verres peuvent être rendus ferromagnétiques en y ajoutant un oxyde ferrique : exposés à un champ magnétique alternatif, ils vont produire de la chaleur et alors être capables de "tuer" d'éventuelles cellules cancéreuses. Ces verres peuvent atteindre 1080 MPa en compression et 225 MPa en flexion. L'apposition osseuse est observée 3 semaines après l'implantation (os immature).

Après 10 semaines, l'os ressemble à de l'os trabéculaire avec une structure composite os / verre.

De tels niveaux de résistance peuvent permettre de transmettre des forces à l'os trabéculaire sans qu'il y ait de fracture du ciment.

Les ciments phosphocalciques mis au point par ces différents chercheurs présentent encore quelques inconvénients.

Exceptés pour le SRS et les verres bioactifs, la tenue mécanique du produit, associée à sa grande solubilité, ne permet pas les applications cliniques souhaitées.

Les expériences décrites par les auteurs sont peu reproductibles [1,2,3,4] . Certains produits ont des analyses physico-chimiques poussées sans que le moindre test biologique d'inocuité n'ait été publié.

ETUDE EXPERIMENTALE

A - INTRODUCTION

Après l'étude bibliographique, notre travail a consisté en l'étude expérimentale d'un nouveau ciment osseux phosphocalcique (COPC). Ce travail comporte essentiellement 4 étapes:

-mise au point de la formulation : l'utilisation des phosphates de calcium comme biomatériaux est largement justifiée par ses analogie avec le minéral osseux [69] ;

-étude physico-chimique : la bonne connaissance des réactifs et du COPC nous a conduit à réaliser des études de granulométrie, de microscopie électronique et de diffraction X ;

-étude des propriétés mécaniques : des mesures de résistance en compression ont été effectuées de façon à vérifier que le COPC ait une tenue mécanique compatible avec les applications envisagées ;

-étude biologique : afin d'évaluer la biocompatibilité de ce ciment, nous avons réalisé des études *in vitro* et *in vivo* sur différents systèmes biologiques.

B - MATERIEL ET METHODES

I. FORMULATION

Nous avons cherché à mettre au point un ciment osseux phosphocalcique (COPC) :

- permettant de réaliser des comblements osseux, de bloquer des prothèses à ancrage biologique,
- se préparant de façon extemporanée et simple, au bloc opératoire ;
- durcissant en 10 min environ ;
- injectable à la seringue ;
- pas ou peu exothermique ;
- biocompatible : le ciment doit être bien toléré par les tissus dans lesquels il est implanté ;
- et si possible bioactif .

Au terme de notre étude bibliographique, nous avons décidé d'utiliser des sels de phosphate de calcium par voie humide.

Nous avons réalisé de nombreux mélanges à partir des sels et des phases liquides suivants :

<u>Réactifs minéraux :</u>	<u>Formules :</u>	<u>Abréviations :</u>
silicate d'aluminium	$Al_2O_3 \cdot SiO_2$	
carbonate de calcium	$CaCO_3$	CC
oxalate de calcium	CaC_2O_4	
sulfate de calcium	$CaSO_4$	
sulfate de calcium hémihydrate (Plâtre de Paris)	$CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$	
phosphate anhydre de calcium	$CaHPO_4$	DCPA
phosphate dihydrate de calcium	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	DCPD
pyrophosphate dicalcique	$Ca_2P_2O_7$	
phosphate monohydrate de calcium	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	MCPM
phosphate tricalcique	$Ca_3(PO_4)_2$	β TCP
hydroxyapatite	$Ca_5(PO_4)_3 \cdot OH$	HAp
oxyde de magnésium	MgO	
silicate de sodium	$Na_2O_7Si_3 \cdot 3H_2O$	

chlorure de zinc	ZnCl ₂
oxyde de zinc	ZnO

Réactifs organiques et divers :

acétone
albumine
acétate de cellulose
glycéro-phosphate de calcium
caséine
collagène de type I
sulfate de chondroïtine
dispersion aqueuse de plastifiant
gélatine
glycérol
formaldéhyde
plasma frais congelé sécurisé
poudre de verre
solution de Ringer lactate

Les différents essais de formulation que nous avons étudiés ont tous été réalisés par le même opérateur, à la même température de salle (entre 19 et 21 °C.). Nous avons éliminé les systèmes qui ne remplissaient pas correctement le cahier des charges, soit à cause d'une prise trop rapide ou trop lente, d'un produit fini trop friable ou trop soluble.

II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

Pour améliorer notre connaissance physico-chimique des matériaux de base retenus, puis du produit fini, nous avons réalisé des études de granulométrie, de microscopie électronique et de diffraction X.

1. Constituants minéraux de départ

Afin de bien caractériser les constituants majeurs de la formule, nous avons réalisé :

-une étude de granulométrie du β TCP sur un SEDIGRAPH 5100, avec en abscisse le

diamètre des grains de poudre exprimé en μm et en ordonnée le pourcentage pondéral / la masse totale en μg . Le β TCP est le réactif le plus important quantitativement (il participe par son arrangement de grains à la construction du ciment).

-une étude de diffraction X : nous avons fait ce travail sur les poudres de départ. Cela nous a permis de répertorier les pics de référence de chaque constituant (avec les longueurs d'onde correspondantes) et de pouvoir les retrouver éventuellement dans le produit fini. La diffraction X a été réalisée sur un diffractomètre avec montage de Bragg Brintano et une calibration avec une longueur d'onde de $1,5405980 \text{ \AA}$.

2. Produit fini : ciment osseux phosphocalcique (COPC)

2. 1. Analyse en microscopie électronique à balayage

Nous avons réalisé une étude en microscopie électronique à balayage sur des éprouvettes de COPC. Les échantillons sont fixés sur un support et métallisés. Nous avons recherché des formations cristallines à la surface et au coeur des éprouvettes.

Cette étude est menée sur échantillons secs :

- avant implantation ;
- après 2 et 4 semaines d'implantation en intramusculaire chez le lapin.

2. 2. Analyse par diffraction X

Nous avons réalisé cette étude dans le but de déterminer l'apparition d'une nouvelle phase et de mettre en évidence une transformation du produit et son évolution dans le temps.

La diffraction X est faite :

- sur le COPC avant implantation ;
- sur des éprouvettes de COPC après implantation en intramusculaire chez le lapin au terme de 1 semaine, 2 semaines et un mois.

III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES

Afin d'éliminer tout produit qui aurait une tenue mécanique incompatible avec les applications envisagées, nous avons réalisé des mesures de la résistance en compression.

Elle est évaluée sur des éprouvettes ($n = 6$) de 6 mm de diamètre et 12 mm de longueur (Norme ISO 5833-Ciments à base de résine acrylique).

Les éprouvettes sont séchées à l'air libre (48 h) puis testées sur une machine d'essais (JJ M30 K) équipée pour enregistrer la compression par rapport à la déformation. La charge maximale est de 500 N et la vitesse de déplacement de la tête de la machine est de 0,5 mm.min⁻¹.

IV. ETUDE BIOLOGIQUE

La formulation du ciment COPC que nous avons retenue en dernier lieu nous a permis d'obtenir un produit dont les propriétés physiques et mécaniques sont intéressantes. Avant d'affiner ce travail de formulation pour améliorer ces caractéristiques, il nous a paru primordial d'effectuer une série de tests biologiques afin d'évaluer une éventuelle toxicité de ce ciment. En effet, il ne servirait à rien d'avoir un ciment avec de bonnes propriétés physico-chimiques qui, par ailleurs, ne serait pas biocompatible.

Pour mener cette évaluation biologique, nous avons suivi les normes applicables aux dispositifs médicaux.

I. Etudes *in vitro* de la cytotoxicité du COPC sur des macrophages de souris

Le but de cette étude est d'évaluer la cytotoxicité du COPC sur des cultures de macrophages de souris. Nous avons suivi les recommandations de la norme NF EN 30 993-5 (IDT ISO 10993-5 : 1992) qui concerne l'évaluation biologique des dispositifs médicaux.

Pour cette étude de cytotoxicité, la norme prescrit des cellules en culture, en contact d'extrait et/ou en contact direct avec le matériau à étudier. Nous avons choisi des cellules macrophagiques pour plusieurs raisons :

- d'une part, ce sont des cellules sensibles à l'environnement extérieur, donc un bon modèle pour étudier la cytotoxicité de notre ciment :

- elles ont la capacité de phagocyter des particules et en particulier, les débris de résine acrylique qui constituent les granulomes péri-prothétiques ; ces granulomes participent à l'ostéolyse dans le descellement des prothèses cimentées. Par analogie, il nous a paru intéressant d'observer une éventuelle phagocytose de notre produit par les macrophages.

- elles sont faciles d'accès en intrapéritonéal chez la souris .

1. 1. Contact d'extraits

1. 1. 1. Milieu de culture des macrophages

Le milieu de culture est constitué d'un milieu de base (RPMI 1640) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et 1% de Pénicilline (10 000 U / ml) / Streptomycine (10 000 μ g / ml).

1. 1. 2. Mode de prélèvement des macrophages

Des souris Swiss mâles sont sacrifiées à l'éther et saignées en carotide gauche. Pour chaque souris, nous avons effectué un lavage péritonéal avec 10 ml de RPMI 1640 glacé additionné de 10 μ l d'héparine dosée à 5000 U / ml. Après centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de culture ; les cellules recueillies sont comptées sur un hémocytomètre de Malassez.

1. 1. 3. Protocole opératoire

Les extraits sont réalisés par incubation d'éprouvettes de COPC (stérilisées au rayons γ) dans le milieu de culture pendant 48 h à 37°C. Nous avons respecté un rapport surface d'échantillon / volume du liquide = 0,9 pour être conforme aux recommandations de la norme précédemment citée. Ce rapport correspond à l'extrait 100 % et celui-ci est dilué avec du milieu de culture pour obtenir des extraits à 50 %, 10 % et 1 %. Les macrophages sont mis en culture avec ces différents extraits. La cytotoxicité des extraits est mesurée par comparaison avec des macrophages témoins. Le contact d'extraits est effectué dans des plaques de culture (NUNC 96 puits) placées dans un incubateur à 37°C, en atmosphère enrichie de 5 % de CO₂. Onensemence tout d'abord chacun des puits avec une densité de 2.10⁵ cellules et 100 μ l de milieu de culture par puits. On laisse les cellules adhérer pendant 3 heures ; seuls les macrophages adhèrent au fond des puits en monocouche. On enlève ensuite le surnageant et on redistribue une quantité identique de milieu de culture. On incube de nouveau pendant 24 heures. Au terme de cette période, on vérifie à la loupe binoculaire la bonne morphologie des cellules avant d'enlever le surnageant dans chacun des puits. Le milieu de culture pour les témoins et les différents extraits sont alors distribués dans leurs puits respectifs :

- puits témoins 1 (n = 6) : monocouche de macrophages + milieu de culture ;
- puits témoins 2 (n = 6) : monocouche de macrophages + milieu de culture incubé dans les mêmes conditions que l'extrait (48 heures à 37°C) ;
- puits avec différents extraits du matériau à tester (n = 6) : monocouche de macrophages + extrait à différentes concentrations (100 %, 50 %, 10 % et 1 %).

La cytotoxicité est mesurée après 24 heures d'incubation, elle est évaluée par la technique du MTT (Bromure de 3 (-4,5 diméthylthiazole de 2-yl 2,5 diphényl) tétrazolium) [9,57,67]. Le MTT est un réactif jaune qui est réduit en formazan (bleu foncé) par les deshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes.

La quantité de formazan formé, déterminée par absorbance à 550 nm, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

1. 2. Contact direct

1. 2. 1. Milieu de culture et prélèvement des macrophages

Le milieu de culture et le prélèvement des macrophages restent inchangés par rapport à l'expérimentation du contact d'extraits.

1. 2. 2. Protocole opératoire

Les différents matériaux à tester (stérilisés au rayons γ) sont déposés directement sur une monocouche de macrophages. Les échantillons sont sous forme de pastilles de 2 mm d'épaisseur et 11 mm de diamètre afin de respecter un rapport surface de l'échantillon / surface du puits de culture = 1/10.

Pour la culture des macrophages, nous avons utilisé des plaques 6 puits (NUNC, ϕ 35mm). On ensemence chacun des puits avec une densité de $4 \cdot 10^6$ cellules et 2ml de milieu de culture par puits. On laisse les cellules adhérer pendant 3 heures ; seuls les macrophages adhèrent au fond des puits en monocouche. On enlève ensuite le surnageant et on redistribue une quantité identique de milieu de culture. On incube de nouveau pendant 24 heures. Au terme de cette période, on vérifie à la loupe binoculaire la bonne morphologie des cellules avant d'enlever le surnageant. Du milieu de culture est distribué ainsi que les différentes pastilles de matériau :

- puits témoin (n = 3) : monocouche de macrophages + milieu de culture ;
- puits avec témoin négatif (n = 3) : pastille en polyéthylène haute densité (PEHD) déposée sur une monocouche de macrophages + milieu de culture ;
- puits avec témoin positif (n = 3) : pastille en polychlorure de vinyle (PVC) déposée sur une monocouche de macrophages + milieu de culture ;
- puits avec témoin de référence (n = 3) : pastille de PMMA déposée sur une monocouche de macrophages + milieu de culture ;
- puits avec matériau à tester (n = 3) : pastille de COPC déposée sur une monocouche de macrophages + milieu de culture.

Après 24 heures d'incubation, on observe tout d'abord à la loupe binoculaire la morphologie des cellules et principalement celles qui sont au contact des différents matériaux. Dans une seconde étape, on évalue la cytotoxicité des matériaux par la technique du bleu trypan [42]. Les cellules vivantes sont imperméables à ce colorant alors que les cellules mortes se colorent en bleu.

Après avoir décollé les macrophages avec de la trypsine, un volume de suspension cellulaire est mélangé à un volume de solution de bleu trypan. Les cellules sont alors comptées sur un hémocytomètre de Malassez et les résultats sont exprimés en % de cellules vivantes.

Dans une autre série de plaques 6 puits, également par contact direct, nous avons réalisé une analyse par microscopie électronique à transmission afin d'observer l'aspect morphologique des cellules ainsi que leurs composants intra-cellulaires.

2. Etudes *in vivo*

2. 1. Essais immunotoxicologiques

2. 1. 1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC

Objectifs

Le but de cette étude est de rechercher la toxicité générale aiguë consécutive à l'injection en intrapéritonéal de l'extrait à 100 % du COPC (suivant les recommandations de la norme NFS 91147).

Protocole opératoire

Nous avons utilisé deux lots de 5 souris SWISS mâles (lot témoin et lot traité).

Pour le lot traité, nous avons injecté (40 ml / Kg) en intrapéritonéal de l'extrait de biomatériaux préparé comme précédemment : norme NF EN 30 993-5 (IDT ISO 10993-5 : 1992). Des éprouvettes stériles de COPC ont été incubées 48 heures à l'étuve à 37°C. dans le milieu de culture (RPMI 1640 + 10 % sérum de veau foetal + 1 % de Pénicilline-Streptomycine) pour respecter un rapport surface/volume de 0,9.

Pour le lot témoin, nous avons injecté (40 ml / Kg) du milieu de culture incubé 48 heures à 37°C.

Protocole d'observation

- examen clinique à partir de la 4^{ème} heure, puis examen quotidien ;
- observation des prises alimentaires ;
- pesée toutes les 48 heures.

La durée totale de l'observation a été de 14 jours.

2. 1. 2. Recherche des signes d'intolérance au COPC

Objectifs

Le but de cette expérimentation est de rechercher les signes d'intolérance consécutive à l'injection en intradermique de l'extrait à 100 % du COPC chez le lapin (suivant la norme NF S 91-148).

Protocole opératoire

Nous avons choisi un lot de 2 lapins mâles néo-zélandais.

L'extrait de biomatériaux a été préparé selon le même protocole que précédemment.

La veille de l'injection, les lapins ont été rasés de part et d'autre de la colonne vertébrale.

Sur chaque animal, nous avons injecté sur le flanc droit (zone traitée), en intradermique 10 fois 0,2 ml d'extrait de biomatériaux et sur le flanc gauche (zone témoin) 5 fois 0,2 ml de milieu de culture incubé 48 heures.

Evaluation des résultats

Après 24, 48, 72 et 96 heures nous avons noté les signes généraux et les signes locaux observés sur les animaux en utilisant le barème suivant :

ERYTHEME

- 0 : rien de visible ;
- 1 : très léger (à peine visible) ;
- 2 : bien visible ;
- 3 : modéré à important ;
- 4 : grave (escarres).

OEDEME

- 0 : rien de visible ;
- 1 : très léger (à peine visible) ;
- 2 : oedème léger (contours définis, gonflement apparent) ;
- 3 : oedème moyen (1 mm d'épaisseur) ;
- 4 : oedème grave.

Les animaux sont pesés à la fin de l'expérience (au 5^{ème} jour) et autopsiés en cas d'anomalie clinique ou de décès pendant le temps de l'expérimentation.

2. 1. 3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC

Objectif

Le but de cette étude est de provoquer une hypersensibilité retardée chez le cobaye selon le protocole de "maximization test" de Magnusson et Kligman [27].

Protocole opératoire

Nous avons utilisé un lot de 20 cobayes adultes mâles.

Les animaux sont rasés entre les omoplates. Les extraits de biomatériaux sont préparés selon le protocole précédemment cité. Le lendemain (1^{er} jour), nous avons effectué l'induction primaire par injections intradermiques :

- adjuvant de Freund à 50 % dans de l'eau pour préparation injectable ;
- extrait à 100 % de COPC (éprouvettes de COPC incubées pendant 48 heures dans le milieu de culture avec un rapport surface / volume = 0,9) ;
- adjuvant de Freund à 50 % dans de l'extrait à 100 % de COPC.

Ces injections, de 0,10 ml chacune, sont distantes de 2 cm de part et d'autre du rachis.

Evaluation des résultats:

Pendant 7 jours, nous avons examiné la zone d'injection, le taux de mortalité et les signes généraux de chacun des animaux.

Au 7^{ème} jour, la zone interscapulaire est préparée à nouveau par rasage, puis badigeonnage de la peau avec une émulsion de lauryl sulfate de sodium à 10 % dans de l'huile de paraffine.

Au 8^{ème} jour, les animaux sont pesés et nous avons réalisé une induction secondaire épicutanée : application, sur la zone préparée, d'un papier filtre Whatmann n° 3 imperméabilisé (4 cm x 2 cm) et saturé avec l'extrait à 100 % de COPC.

Après 48 heures d'application, les cobayes sont examinés sur une période de 5 jours et la réaction cutanée est notée avec le barème suivant :

- 0 : rien de visible ;
- 1 : rougeur discrète dispersée ;
- 2 : rougeur modérée diffuse ;
- 3 : rougeur diffuse et gonflement.

Après 21 jours d'observation, nous avons réalisé une application topique secondaire déclenchante : les animaux sont rasés sur les flancs. Un des flancs constitue le témoin et le deuxième reçoit un morceau de papier filtre Whatmann n° 3 imperméabilisé (2 cm x 2 cm) et saturé avec l'extrait à 100 % de COPC. Ce filtre reste en place 24 heures. La lecture est effectuée selon le même barème pendant encore 48 heures.

En fin de protocole les animaux sont sacrifiés et autopsiés dans le cas de réaction positive.

2. 2. Implantations chez l'animal (lapin)

Nous avons suivi les recommandations de la norme NF S 90 703 qui évalue la tolérance d'un biomatériau destiné à entrer en contact avec les tissus musculaires et osseux.

2. 2. 1. Implantations en intramusculaire

Objectif

Ces implantations ont pour but d'étudier la réponse inflammatoire d'un tissu mou au produit implanté par rapport à un produit de référence utilisé dans la même application en clinique humaine depuis plus de 5 ans. Nous avons donc pris en référence le polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Pour des commodités d'implantation, les éprouvettes du produit testé (COPC), comme les éprouvettes de PMMA, ont un diamètre de 4 mm et une longueur de 10 mm. Elles sont stérilisées par irradiation γ .

Protocole opératoire

Principe : des éprouvettes sont implantées chirurgicalement en intramusculaire paravertébral sur des lapins néo-zélandais adultes. Trois séries de 2 lapins sont implantées. L'explantation a lieu aux termes suivants : 1 semaine, 2 semaines et 1 mois.

Intervention : Les lapins sont rasés la veille de l'intervention. L'anesthésie générale est réalisée à l'aide d'une injection première d'un α -2 adrénergique suivie d'une injection de kétamine. La peau est désinfectée à l'aide d'une solution antiseptique. Dans les muscles paravertébraux gauches nous avons implanté 3 éprouvettes de COPC (2 pour analyse anatomo-pathologique, 1 pour une étude en diffraction X) et 1 éprouvette témoin de PMMA à droite.

Les animaux sont maintenus en atmosphère chaude pour le réveil.

Quotidiennement, plusieurs contrôles sont effectués :

- mortalité ;
- examen du site opératoire ;
- examen clinique général ;
- motricité.

Evaluation des résultats : sacrifice et analyse anatomo-pathologique

Les animaux sont sacrifiés à chaque terme et les échantillons sont prélevés en emportant un bloc de 0,5 cm de tissu minimum autour de chaque échantillon. Les biopsies sont fixées pendant 48 heures dans du liquide de Bouin puis incluses en paraffine. Les coupes sont colorées à l'Hématéine-Eosine-Safran qui colore respectivement les noyaux, le cytoplasme et le collagène. Nous avons recherché les signes d'inflammation autour et à distance de l'implant, l'épaisseur de la couche fibreuse, les cellules rencontrées en périphérie et la colonisation éventuelle de l'implant.

2. 2. 2. Implantations en intra-osseux

Objectif

Ces implantations ont pour but d'étudier la réponse de l'os au produit implanté par rapport à un produit de référence utilisé dans la même application en clinique humaine depuis plus de 5 ans. Nous avons donc pris en référence le PMMA. Les éprouvettes sont de 2 mm de diamètre x 6 mm de longueur. Elles sont stérilisées par irradiation γ .

Protocole opératoire

Principe : nous avons implanté dans les fémurs de lapins néo-zélandais 2 éprouvettes de COPC à droite, une éprouvette de COPC et une éprouvette de PMMA à gauche. Ces éprouvettes sont distantes de 2 cm. Deux lots de 2 lapins sont implantés. Ils sont respectivement sacrifiés à 4 et 6 semaines.

Intervention : les lapins sont préparés et opérés selon le même protocole anesthésique que pour l'implantation intramusculaire. Les éprouvettes sont implantées en diaphyse fémorale de façon bilatérale ; les trous d'implantation sont réalisés avec une mèche de 2,2 mm de diamètre, montée sur un mini-moteur.

Evaluation des résultats : sacrifice et analyse anatomopathologique

Les animaux sont sacrifiés à chaque terme et les échantillons prélevés. Les biopsies sont fixées dans le formol, décalcifiées, incluses en paraffine puis colorées. Les éprouvettes témoins de PMMA ont été préalablement dissoutes dans de l'alcool méthylique. Nous avons recherché la réaction inflammatoire autour de l'implant, l'épaisseur de la couche fibreuse, le type des cellules qui y participent et la colonisation de l'implant.

C - RESULTATS

I. FORMULATION

La composition du COPC est la suivante :

Composants en poudre :

- β TCP	(48,48 % en masse)
-MCPM	(24,24 % en masse)
-sulfate de calcium	(24,24 % en masse)
-glycérophosphate de calcium	(03,03 % en masse)

Phase liquide :

-dispersion aqueuse de copolymère d'esthers acryliques et méthacryliques

Préparation :

Les différents sels de calcium sont pesés, mélangés, puis finement pulvérisés dans un mortier. Le liquide est versé en totalité sur la poudre avant d'être mélangé à celle-ci. Le COPC prend en masse en 5 min environ. La réaction n'est pas exothermique. Le produit présente initialement une phase liquide où il est injectable à la seringue pendant 1 à 2 min, puis une phase plastique de 3 à 4 min. Le rapport poudre / liquide = 1,2.

II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

1. Constituants minéraux de départ

Sédigraphie :

La courbe de granulométrie du β TCP est centrée sur une valeur de 4,3 μm pour 50 % de la masse.

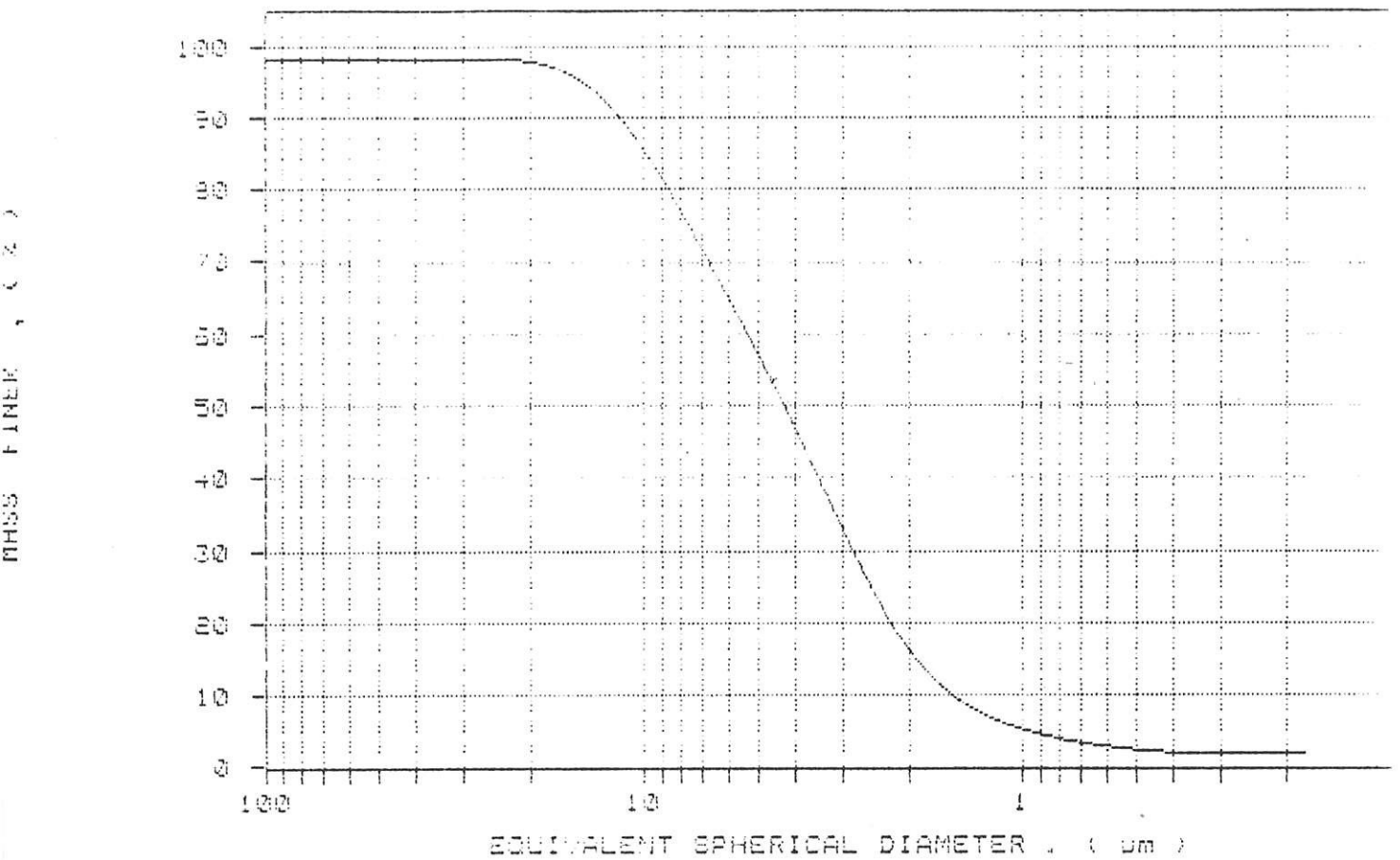
10 % des grains ont une taille de 1,6 μm et 10 % des grains une taille de 12,5 μm . On se trouve en présence d'une phase tri-granulaire.

Courbe de granulométrie:

- en abscisse : le diamètre des grains de poudre est exprimé en micromètres
- en ordonnée : pourcentage pondéral / masse totale en %

Courbe de granulométrie:

CUMULATIVE MASS PERCENT FINER VS. DIAMETER



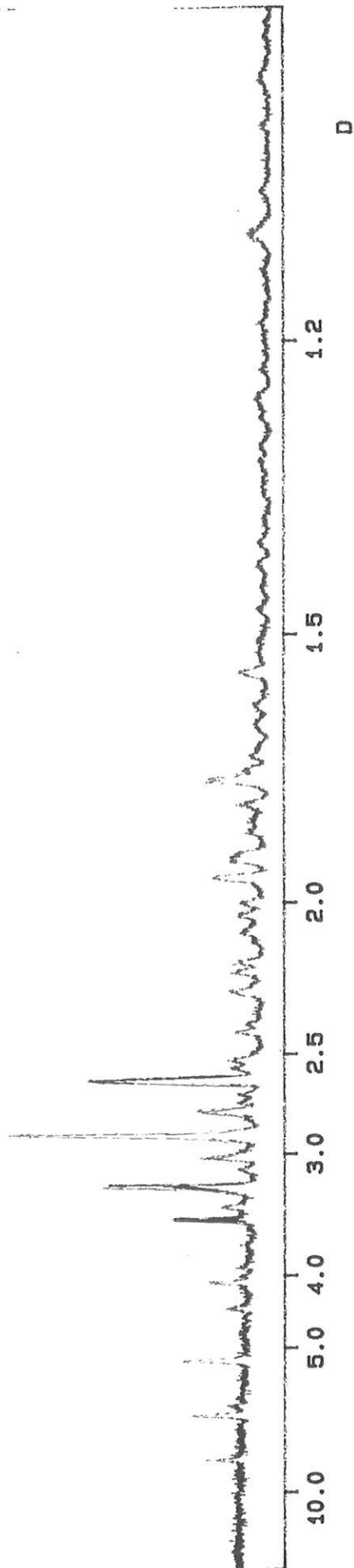
Diffraction X:

La diffraction X met en évidence des pics à des longueurs d'onde variables caractéristiques pour chacun des éléments.

Courbe n° 1: le β TCP Courbe n° 2: le MCPM

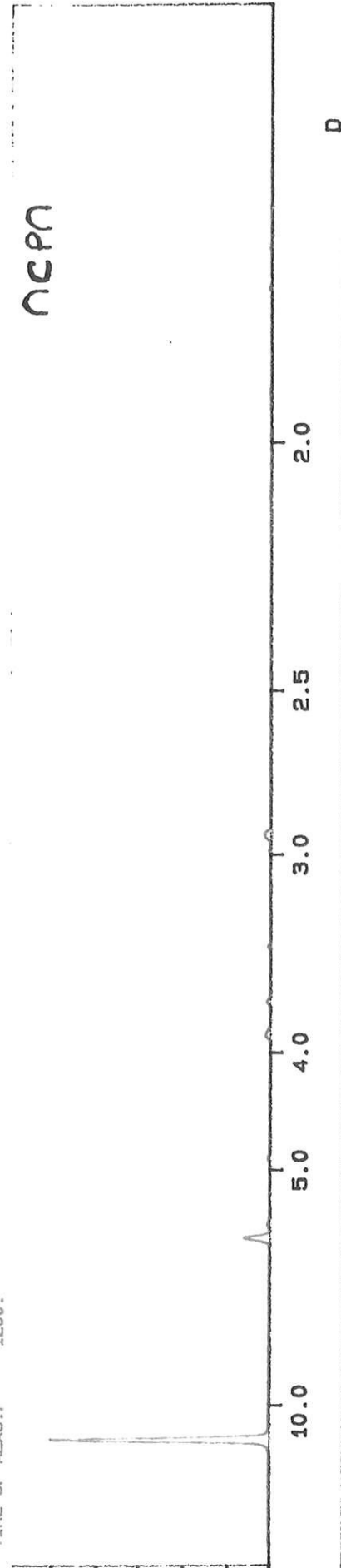
FILENAME: d: ctd.DAT
TIME OF MEAS.: 1200.
DATE : 19/ 3/96 15: 48
RESOLUTION: 4096 LIN ECH-TOTALE : 2000.00

β TCP



FILENAME: d: ctd.DAT
TIME OF MEAS.: 1200.
DATE : 19/ 3/96 15: 16
RESOLUTION: 4096 LIN ECH-TOTALE : 60000.00

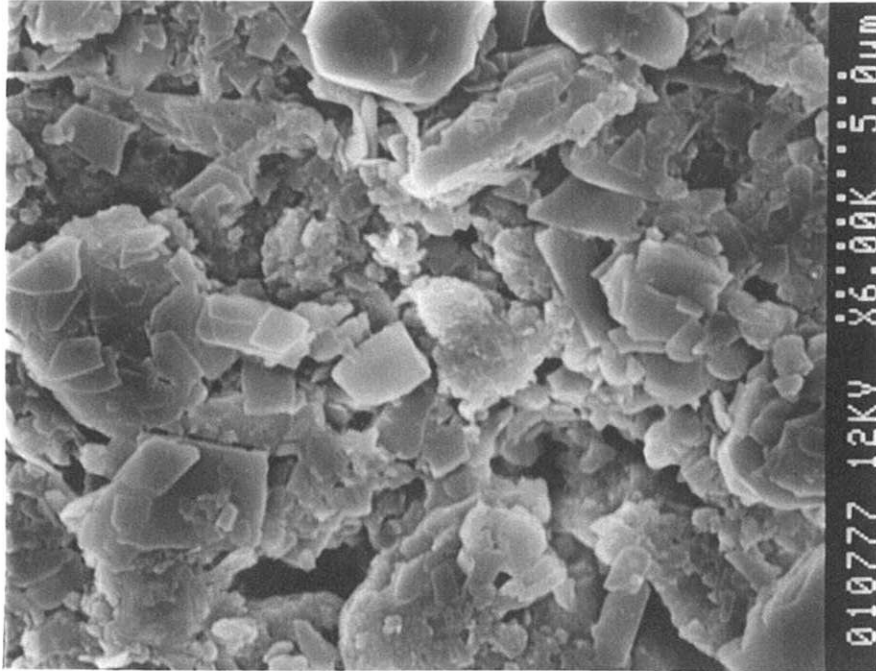
MCPM



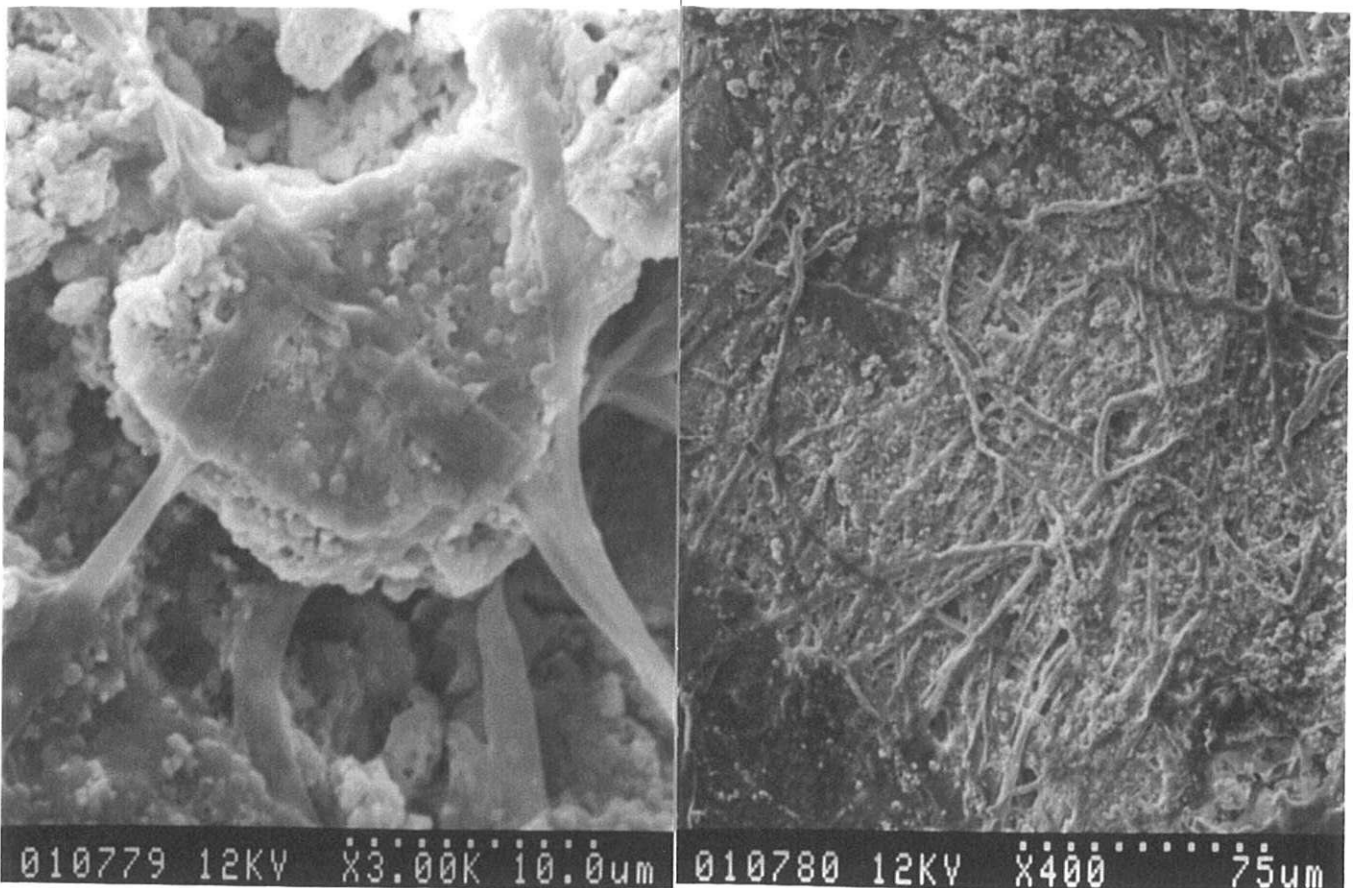
2. Produit fini : ciment osseux phosphocalcique (COPC)

2. 1. Analyse en microscopie électronique à balayage

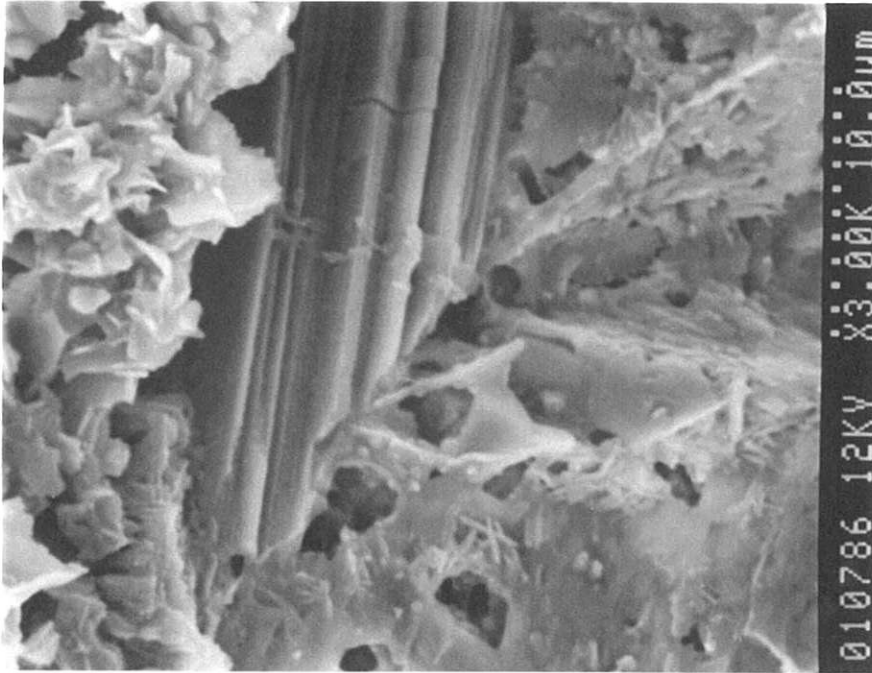
Les échantillons de COPC sont constitués d'amas de cristaux plats englobés dans une phase vitreuse dont la quantité est variable d'une zone à l'autre .



Après 15 jours d'implantation, la proportion de la phase vitreuse diminue, il apparaît en surface un réseau de rubans plats. Les cristaux sont érodés.



Après un mois, on observe, sur la surface des échantillons, une disparition complète de la phase vitreuse et on voit apparaître des cristaux tubulaires.



2. 2. Analyse par diffraction X

Sur le produit fini, avant implantation, on retrouve les pics de diffraction des constituants initiaux mais avec des variations de longueurs d'onde qui caractérisent l'évolution des composés

Courbe n°3 : Diffraction X du COPC avant sa pose

Sur le produit fini, après implantation, la phase évolue entre les premiers échantillons (1 semaine d'implantation) et les derniers (4 semaines).

Après 4 semaines, le produit diffracte mieux, il apparait une meilleure cristallisation et une disparition de la phase amorphe.

Courbe n°4: COPC explanté à 1 semaine

Courbe n°5: COPC explanté à 2 semaines

Courbe n°6: COPC explanté à 4 semaines

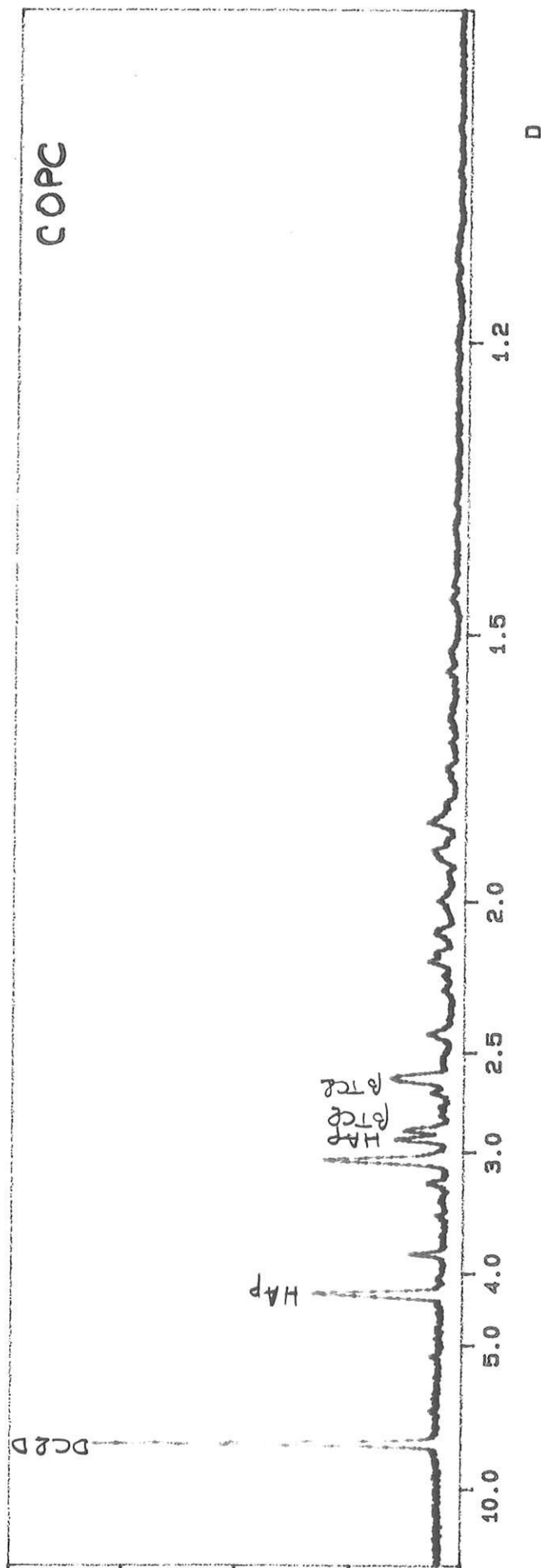
Courbe n°3 : Diffraction X du COPC avant sa pose

RESOLUTION: 4096 LIN ECH-TOTALE : 4000.00

DATE : 19, 3, 96 16: 33

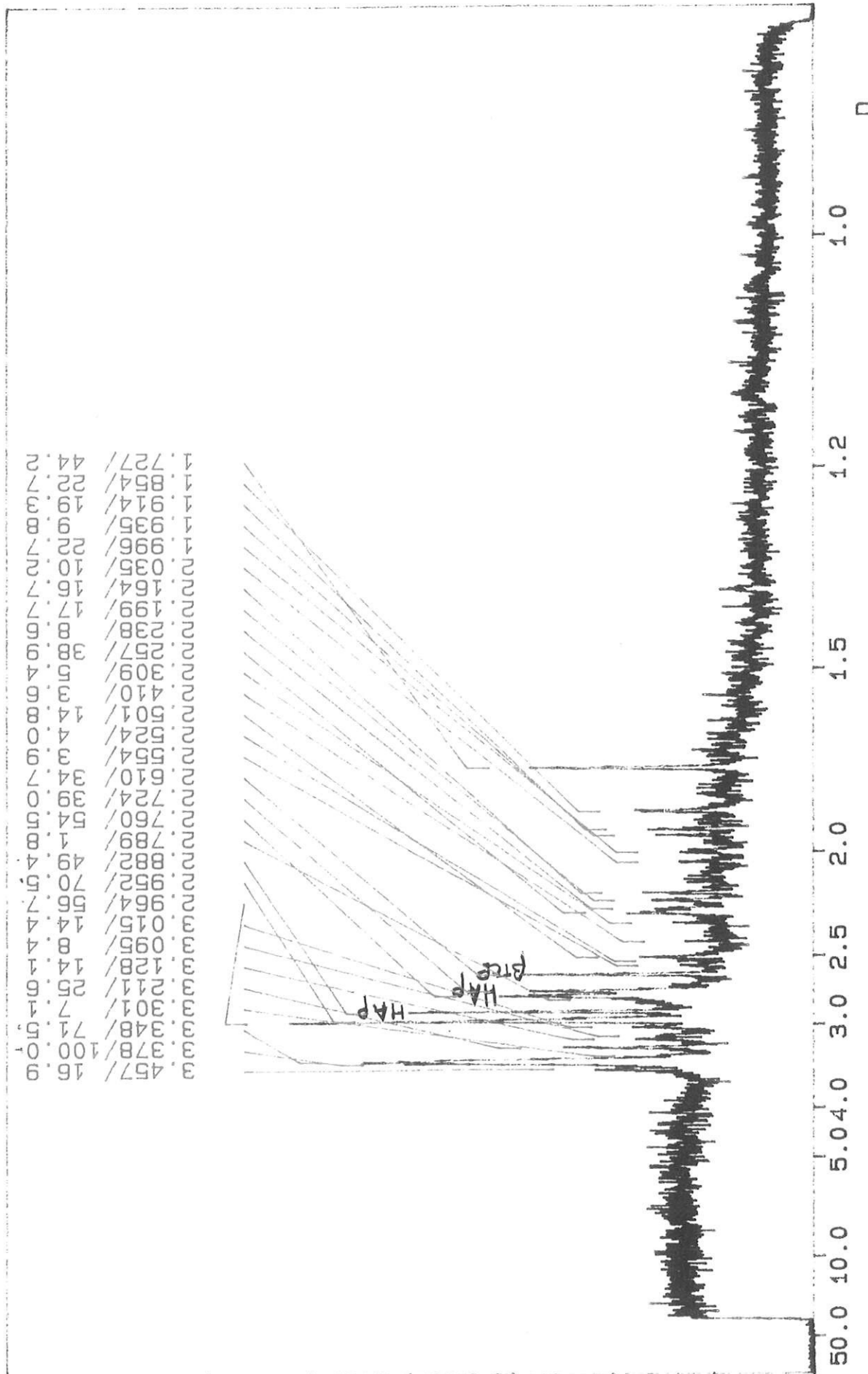
FILENAME: cts.DAT

TIME OF MEAS.: 1200.



Courbe n°4: COPC explanté à 1 semaine

D I F F R A C T I N E L I N E L
SAMPLE d: ct7.DAT d: ct7.FXD LIN Y-MAX= 800.00 THRESHOLD: 0.00%

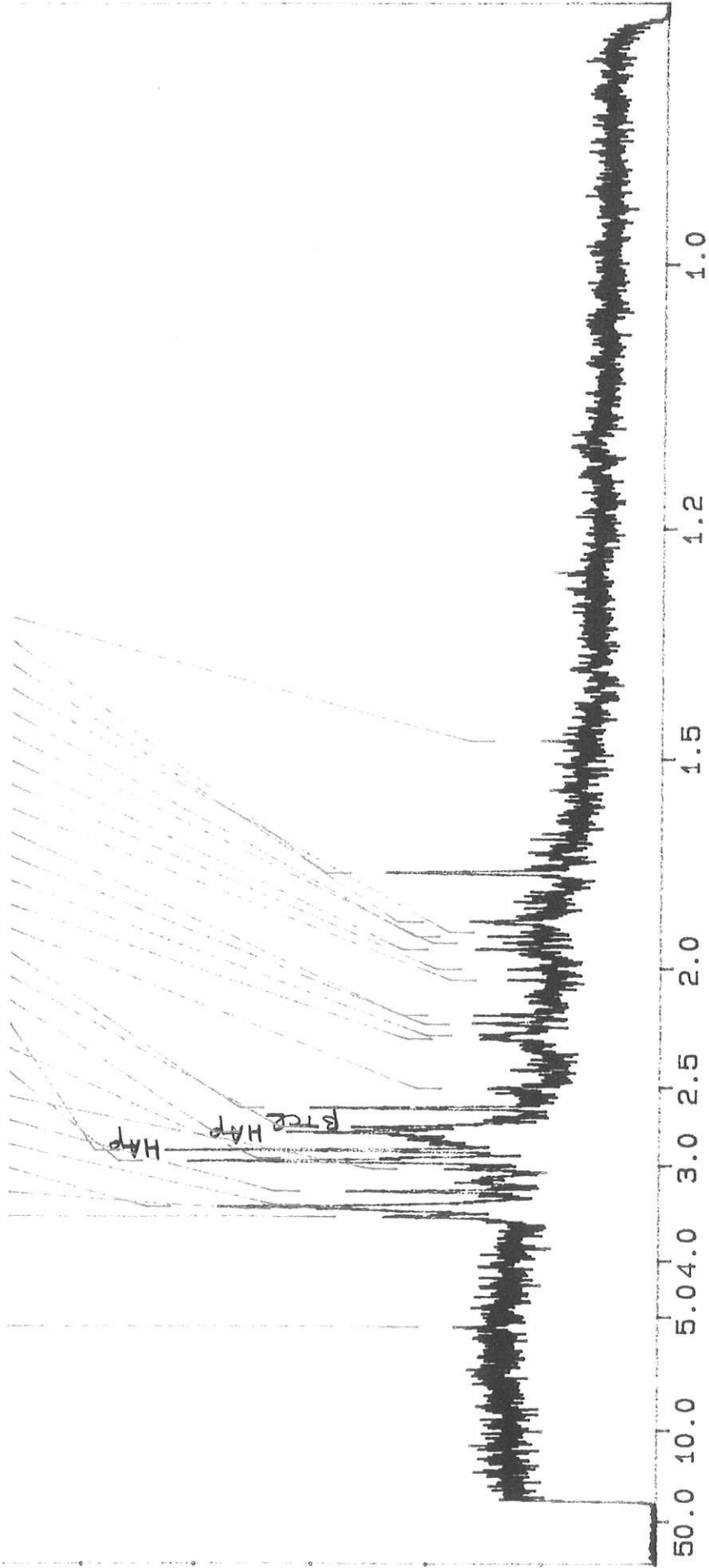


457	378	348	301	211	128	095	015	964	952	882	789	724	760	610	554	524	501	410	309	257	238	199	164	135	110	996	935	914	854	727
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

CALIBRATION: d: na080796.CAL
LAMBDA= 1.5405980 A, U= 0.00 KV, I= 0.00 MA, DATE= 8/ 7/96 14: 18, T= 1200.SEC

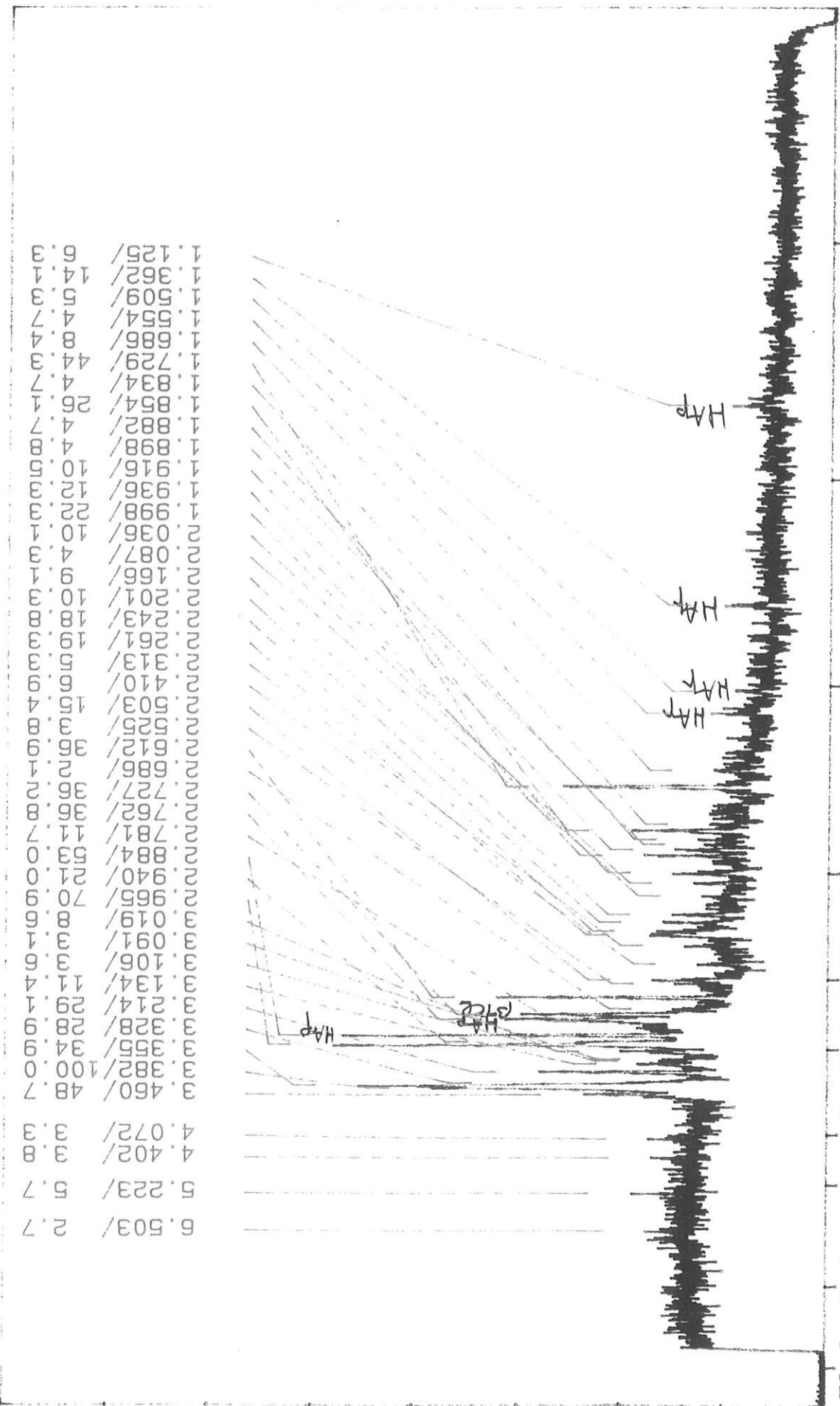
D I F F R A C T I N E L I N E L
 implantation 14 jours 800.00 THRESHOLD: 0.00%
 SAMPLE d: ct14.DAT d: ct14.FXD LIN Y-MAX=

5.224/	10.1
459/	42
381/	100.0
360/	27.0
339/	48.0
214/	39.0
023/	14.0
965/	98.0
941/	23.0
885/	66.0
762/	49.0
612/	72.0
502/	26.0
249/	22.0
200/	14.0
166/	14.0
036/	14.0
999/	14.0
936/	14.0
916/	14.0
897/	14.0
883/	14.0
722/	14.0
469/	14.0



CALIBRATION: d: na080796.CAL D
 LAMBDA= 1.5405980 A, U= 0.00 KV, I= 0.00 MA, DATE= 8/ 7/96 14: 54, T= 1200.SEC

D I F F R A C T I N E L
 SAMPLE d: ct30.DAT d: ct30.FXD implantation 30 jours I N E L
 LIN Y-MAX= 800.00 THRESHOLD: 0.00%



50.0 10.0 5.04.0 3.0 2.5 2.0 1.5 1.2 1.0 D
 CALIBRATION: d: na080796.CAL
 LAMBDA= 1.5405980 A, U= 0.00 KV, I= 0.00 MA, DATE= 8/ 7/96 15: 30, T= 1200.SEC

III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES

La résistance à la compression du COPC est mesurée à $15 \text{ MPa} \pm 2 \text{ MPa}$ soit $1,5 \text{ Kgf}$ (Kg/cm^2).

IV. ETUDE BIOLOGIQUE

1. Etudes *in vitro* de la cytotoxicité du COPC sur les macrophages de souris

1. 1. Contact d'extraits

	Densité optique à 550 nm	% de cellules vivantes
témoin	$0,241 \pm 0,023$	100
témoin + milieu incubé	$0,277 \pm 0,026$	114
extrait 100 %	$0,031 \pm 0,002$	12
extrait 50 %	$0,090 \pm 0,011$	37
extrait 10 %	$0,301 \pm 0,021$	124
extrait 1 %	$0,271 \pm 0,026$	112

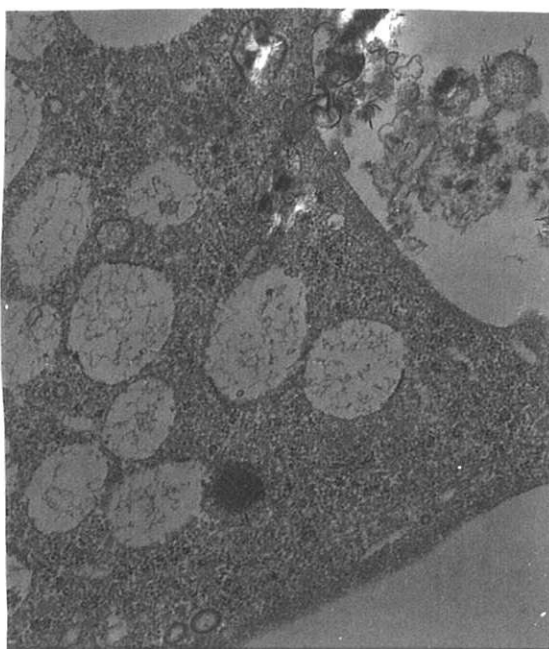
Le pourcentage de cellules vivantes est calculé pour chacun des puits. On prend pour référence (100 %) le témoin cultivé dans les conditions standards.

1.2. Contact direct

	Microscopie photonique	% de cellules vivantes	Microscopie électronique à transmission
témoin	cellules rondes répartition homogène	100	morphologie normale
témoin + (PVC)	cellules concentrées autour de la pastille	85	
témoin - (PEHD)	cellules rondes répartition homogène	100	
COPC	grandes cellules rondes dépôts noirs intra-cell.	15	altération cellulaire cristaux d'HAp (photo 1)
PMMA	petites cellules rondes autour de la pastille	65	morphologie normale (photo 2)

Sur les photos en microscopie électronique à transmission, les cellules au contact du COPC ont phagocyté des cristaux ayant toute les caractéristiques des cristaux d'hydroxyapatite ; ces cellules sont très altérées pour la plupart.

Photo n°1: culture cellulaire au contact du COPC (grossissement X 21 000)



Cristaux

Photo n°2: culture de macrophages sans COPC (grossissement X 15 500)



2. Etudes *in vivo*

2.1. Essais immunotoxicologiques

2. 1. 1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC

Nous n'avons constaté aucune mortalité. L'examen clinique est normal, identique pour le lot traité et le lot témoin. Le produit ne provoque pas de toxicité générale aiguë en intrapéritonéal chez la souris.

2. 1. 2. Recherche des signes d'intolérance au COPC

Au cours de l'expérience, nous n'avons constaté aucune mortalité. Les lapins ne présentent localement aucun oedème, ni érythème (coté 0 tout au long de l'expérimentation). Les zones témoins sont identiques aux zones traitées. Le produit ne provoque pas d'intolérance intradermique.

2. 1. 3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC

Les cobayes sont tous survivants et le comportement des animaux est normal au cours de l'expérience.

A partir de J + 4, avec l'adjuvant de Freund, tous les animaux présentent une réaction de type 3 (rougeur intense et gonflement). Au 7^{ème} jour, 3 animaux sur 20 présentent une réaction escarriforme au point d'injection du mélange extrait + adjuvant de Freund.

Nous n'avons constaté aucune réaction lors des applications déclenchantes. Le produit n'a pas provoqué de réaction d'hypersensibilité retardée chez ces cobayes.

2. 2. Implantations chez l'animal

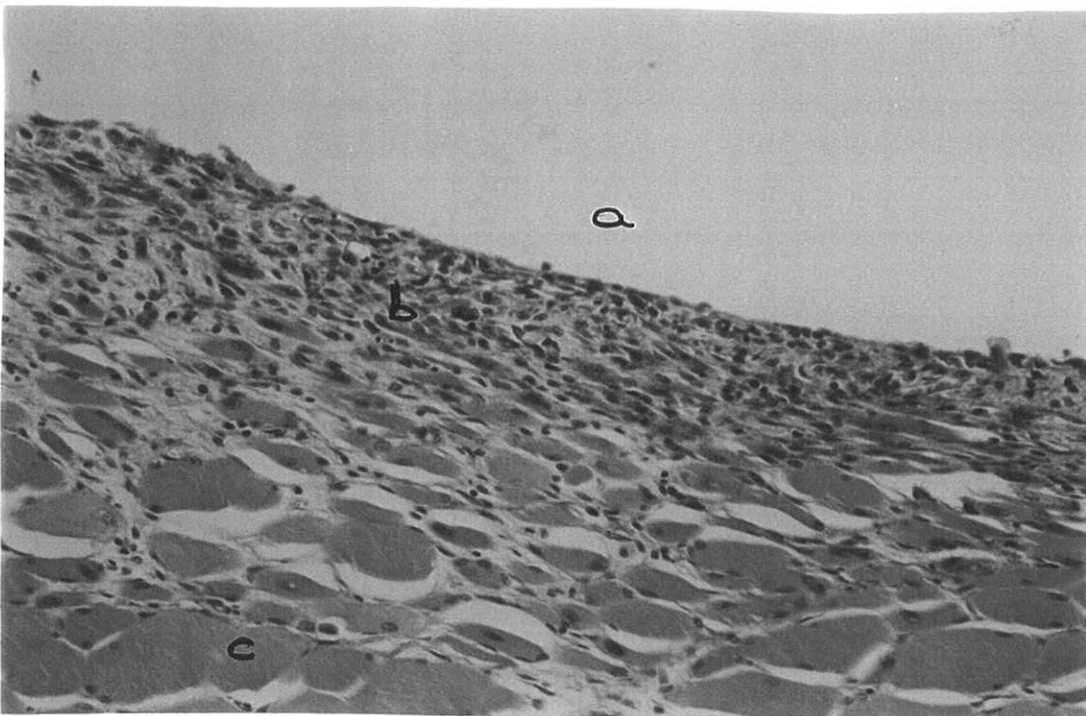
Les éprouvettes de COPC ont été implantées chez le lapin en intra-musculaire et en intra-osseux.

2. 2. 1. Implantation en intra-musculaire.

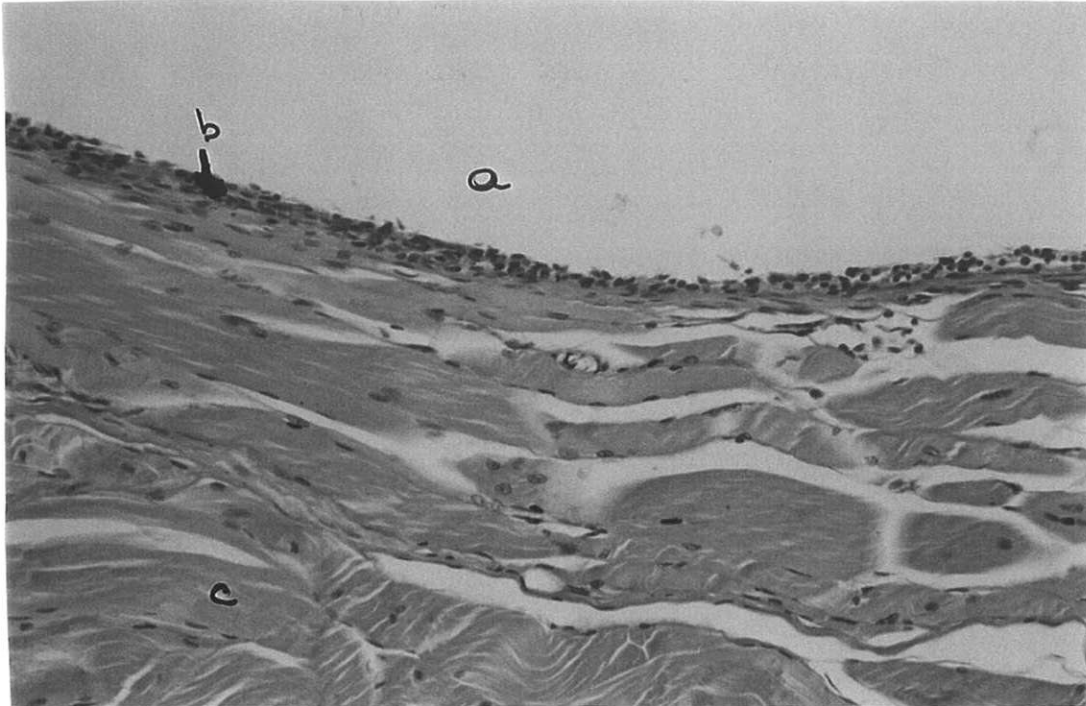
Nous avons observé que se formait au cours des semaines une couche fibreuse autour de l'échantillon.

Pour une éprouvette de PMMA, la couche de réaction mesure initialement 50 μm . Cette couche fibreuse est fortement cellulaire au départ, constituée de fibroblastes. A 4 semaines, elle mesure 15 μm . Les cellules se disposent le long de fibres collagènes parallèles par rapport à la périphérie de l'échantillon. L'évolution se traduit par une fine couche d'encapsulation fibreuse.

PMMA : 1 sem. d'implantation (x 20)

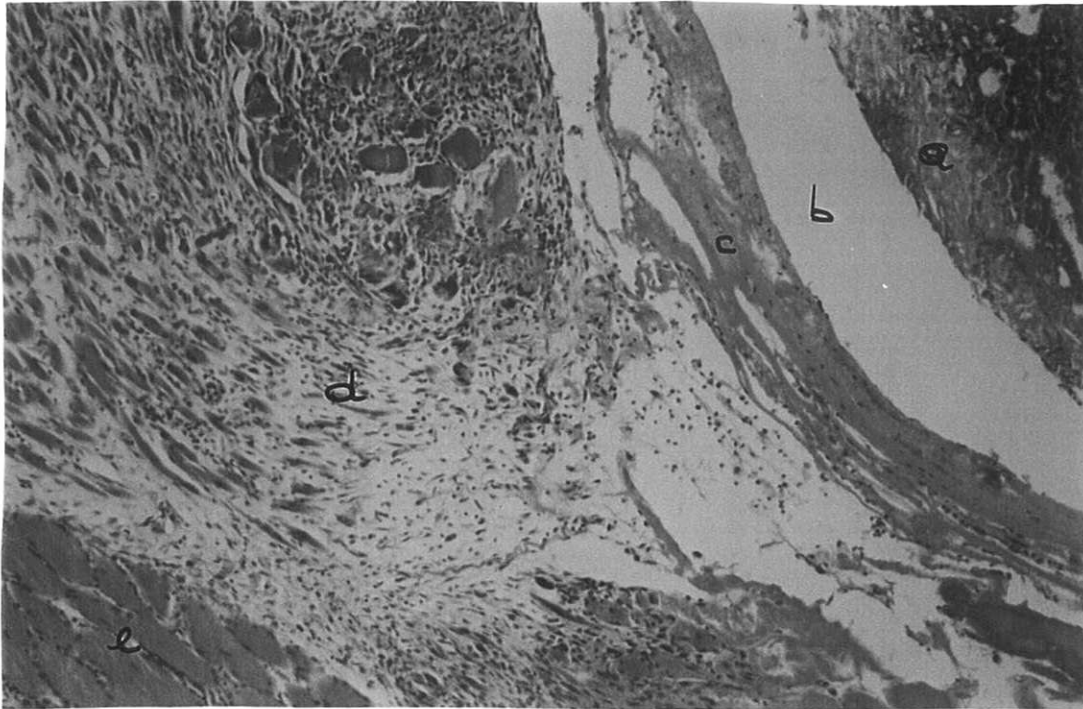


a) place de l'échantillon b) réaction fibreuse c) muscle normal



a) place de l'échantillon b) réaction fibreuse c) muscle normal

Pour le COPC, les éprouvettes sont hétérogènes avec de nombreuses bulles et fissures qui ne sont pas uniquement des artefacts de coupe. A 8 jours la réaction mesure 75 μm ; elle est très fortement cellulaire, les fibroblastes commencent à occuper une disposition concentrique et ils adhèrent à l'éprouvette. Les cavités ne sont pas réhabitées. Des cellules musculaires en dégénérescence sont intimement au contact de l'échantillon et forment des cellules géantes multinucléées de type syntitial avec des noyaux arrondis en périphérie.



a) échantillon de COPC b) artéfact de préparation c) cellules musculaires en dégénérescence
d) réaction inflammatoire e) muscle normal

Progressivement, on observe la disparition des cellules musculaires en dégénérescence et une couche cellulaire fibroblastique adhère intimement à la surface du produit. Celle-ci s'insère dans les cavités et participe au processus de réhabitation.

À 4 semaines, des cellules géantes multinuclées au fond des cavités sont apposées le long du produit. La couche de fibrose périphérique est organisée avec une disposition concentrique des cellules fibroblastiques et des fibres de collagène. Elle mesure 15 à 20 μm .

Pour aucun des deux types d'échantillon nous n'avons noté de nécrose cellulaire de contact ou en périphérie, ni de signes d'inflammation à distance.



a) COPC b) cavité réhabilitée c) cellules adhérant au COPC d) décollement autour de l'échantillon: artéfact de coupe e) réaction fibreuse périphérique f) muscle normal

2. 2. 2. Implantation en intra-osseux.

Après dissolution des éprouvettes de PMMA dans de l'alcool méthylique, nous observons la réaction suivante:

- au contact de l'échantillon, disposition d'une couche de cellules géantes plurinucléées à chromatine fine et au cytoplasme légèrement basophile,
- puis, fine couche d'encapsulation fibreuse avec 5 rangées de fibroblastes disposés le long des fibres de collagène,
- puis, moelle osseuse normale.

On ne note aucune construction osseuse en périphérie.

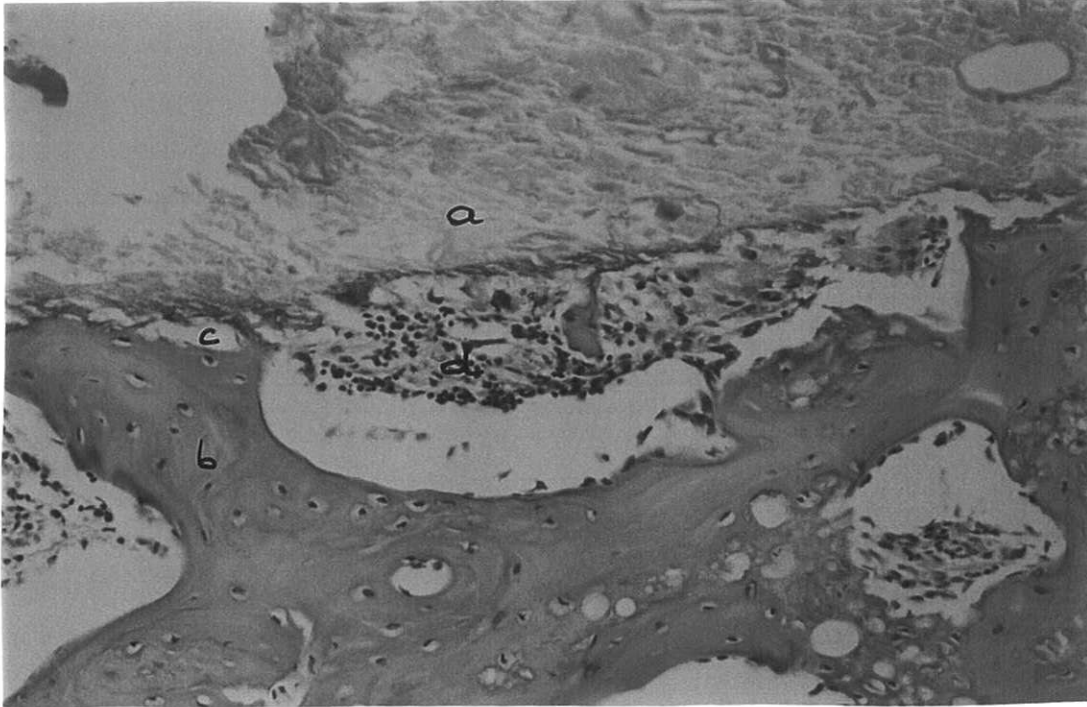
A 4 semaines d'implantation, on retrouve autour du COPC trois types de contact :

- les travées osseuses peuvent être immédiatement en contact avec le COPC,
- des cellules géantes à cytoplasme éosinophile sont intimement accolées au COPC,
- une couche de cellules histiocytaires adhère à la surface du COPC. Cette couche s'immisce dans les moindres cavités qui sont alors réhabilitées.

COPC : 4 semaines d'implantation (intra-osseux) (x20)

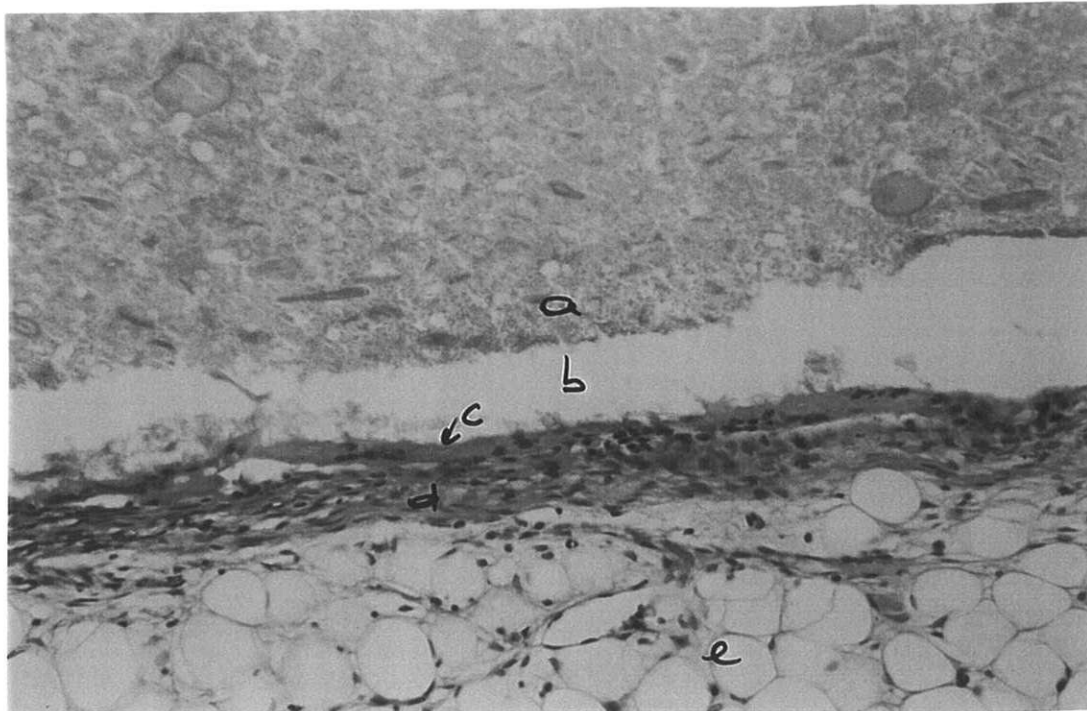
-les travées osseuses sont au contact du COPC,

-une couche de cellules histiocytaires adhère à la surface du COPC :



a) COPC b) travées osseuses c) artéfact de coupe d) réaction inflammatoire histiocytaire

-accolement de cellules géantes: (x20)



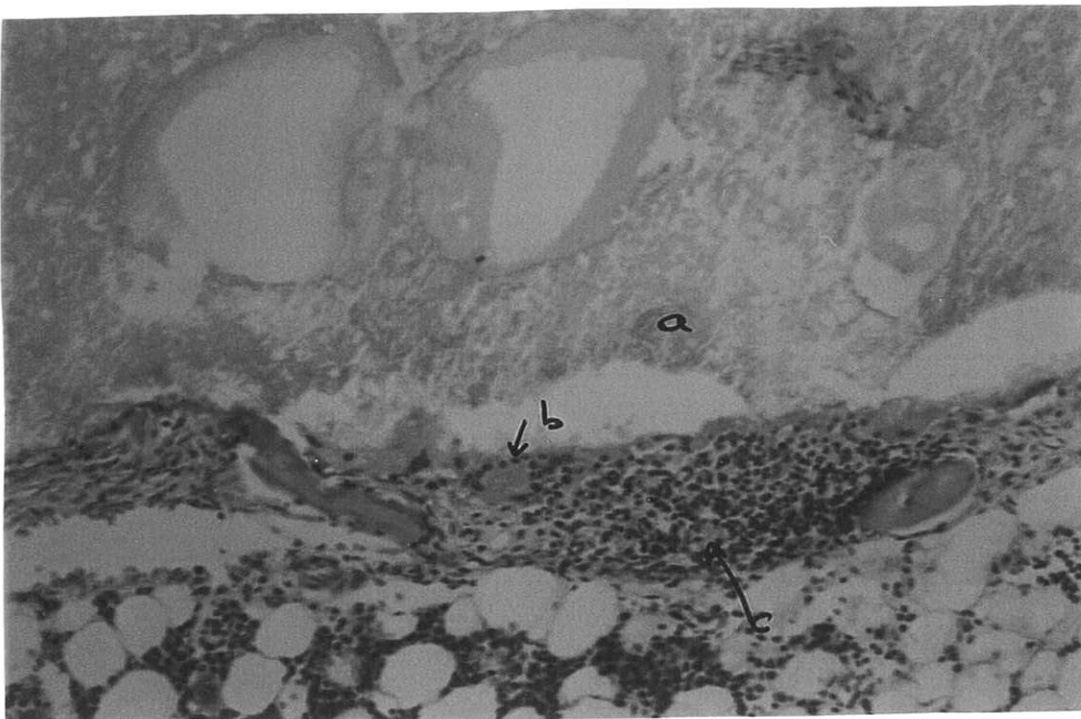
a) COPC b) artéfact de coupe c) cellules géantes d) réaction fibreuse e) moelle normale

A 6 semaines, on retrouve ces trois types de contact.

L'épaisseur des travées au contact du COPC augmente. On note une ostéogenèse sur tout le tour de l'échantillon. En périphérie du COPC les travées sont en contact intime avec parfois du produit incorporé dans l'os néoformé. Sinon le COPC est séparé de l'os adjacent par un granulome de type histiocytaire dans lequel on retrouve de nombreux vaisseaux. Cette couche cellulaire hypervascularisée réhabite les cavités qui présentent une communication avec la surface.

Le granulome est constitué au contact du ciment de cellules géantes dont le cytoplasme se charge en vacuoles spumeuses et à distance d'histiocytes spumeux.

COPC : 6 semaines d'implantation (intra-osseux) (x20)



a) COPC b) cellules géantes avec vacuoles spumeuses c) histiocyte spumeux

- cavité réhabilitée



a) COPC b) cellules géantes c) surface de l'échantillon d) vaisseaux sanguins

D - DISCUSSION

I- FORMULATION ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

Nous avons étudié des ciments dans le système β TCP / MCPM à prise hydraulique.

Les tests de ces ciments ont été, dans un premier temps, empiriques : travaillabilité, solubilité, temps de prise, tenue mécanique. A partir des données de la littérature, nous avons pour des produits de départ donnés, réalisé de nombreux mélanges.

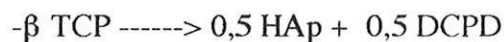
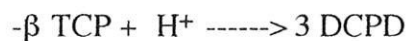
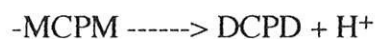
Un ciment à base de β TCP / MCPM a rempli le mieux notre cahier des charges. Nous l'avons amélioré en utilisant des modulateurs du setting time qui, dans notre formule, sont des sels de phosphate de calcium. Pour diminuer la solubilité et augmenter la tenue mécanique, nous avons utilisé comme phase liquide la dispersion aqueuse d'un plastifiant.

La résistance mécanique de ce type de ciment serait dûe à deux phénomènes [53][54] :

- transformation du MCPM et cristallisation en DCPD avec libération de protons,
- dissolution partielle du β TCP.

La dissolution compense l'acidification du système produite par l'hydrolyse du MCPM. La cristallisation précoce en DCPD établirait des ponts entre les particules de β TCP.

La réaction d'après MIRTCHI et LEMAITRE [53][54] se déroulerait comme suit:



Le DCPD est un précurseur qui permet la nucléation de l'apatite.

Nous avons essayé de corroborer cette hypothèse en analysant nos échantillons en diffraction X.

Les études menées en diffraction X sur les éprouvettes de COPC avant implantation montrent des cristaux de DCPD. Le MCPM, quant à lui, a disparu du produit. Il se forme quelques raies d'hydroxyapatite. Au 14^{ème} jour, la quantité d'hydroxyapatite augmente, le COPC est mieux cristallisé. Au 30^{ème} jour, de nombreuses raies caractéristiques de l'hydroxyapatite sont présentes.

Ces résultats ne sont que des approximations car l'analyse des raies de diffraction est très délicate à interpréter et, de plus, nous n'avons analysé qu'un échantillon par terme. Les approximations se font par une assimilation pour des variations de distance inter réticulaire de 0,03 - 0,05 .

Néanmoins, ces premiers résultats sont conformes aux données de la littérature [53][54]. On peut donc émettre l'hypothèse que dans le COPC, dans un premier temps le MCPM cristallise en DCPD. Le système devient acide et cette acidité est compensée par la dissolution partielle du β TCP : il se forme des ponts entre les cristaux. Au cours du temps, le produit perd progressivement sa phase amorphe et il diffracte mieux, des raies d'hydroxyapatite apparaissent. La formation d'hydroxyapatite semble être précoce, car lors de la réalisation des extraits de COPC pour les cultures cellulaires, des cristaux semblables à ceux de l'hydroxyapatite se forment : ils sont mis en évidence sur les images de microscopie électronique prises sur les cultures cellulaires.

Les éprouvettes étant implantées en intra-musculaire, il n'y a aucune participation des cellules osseuses à la transformation du produit : le phénomène est indépendant du site d'implantation. Ces transformations de phases sont des phénomènes physico-chimiques purs de dissolution reprecipitation [82].

La résistance mécanique en compression du ciment est de 15 MPa. Le ciment prend en 5 minutes ce qui est compatible avec les applications envisagées. Le "setting time" initial serait dû à la transformation du MCPM en DCPD. Sa résistance en compression nous autorise à nous servir de ce matériau en comblement, mais pas en zone portante. En effet, sa résistance mécanique est à peu près équivalente à celle de l'os spongieux. Dans les études bibliographiques, nous avons noté que les ciments phosphocalciques ont plutôt une résistance de 5 MPa que de 15 MPa. Toutefois nos mesures, ainsi que celles relevées dans la littérature ont été prises sur échantillons secs ce qui ne correspond pas aux conditions normales d'utilisation en milieu humide.

Nous avons constaté lors des manipulations que ce ciment présente une phase où il est très fluide. Cela lui permet de pénétrer correctement dans les porosités des matériaux pouvant par exemple entraîner un contact intime entre le produit et les travées osseuses. Cette fluidité pourrait lui permettre de jouer un rôle en traumatologie, notamment dans les fractures des épiphyses souvent comminutives associées à une impaction de l'os spongieux.

L'étude en granulométrie a été menée sur le β TCP car c'est le constituant principal. L'analyse sédiographique du β TCP montre une taille moyenne des cristaux de 4,3 μm ce qui est modéré. L'avantage en plus du β TCP est de présenter une phase trigranulaire qui permet de réaliser un ciment avec plus de cohésion grâce à l'arrangement complémentaire des trois tailles principales de grains. Un travail ultérieur étudiera l'influence de la taille des grains sur la résistance mécanique du ciment.

Le résultat des études d'Otsuka [61] et de Lemaitre [54] sont contradictoires sur ce sujet.

Sur les clichés de microscopie électronique à balayage, la surface présente des failles. La substance amorphe qui englobe les grains (le liant) est elle aussi irrégulière selon la zone intéressée. L'assemblage des grains est lui aussi irrégulier.

Nous en avons déduit que le mélange des poudres au mortier n'est pas suffisant. La méthode d'homogénéisation des poudres est à améliorer. Le mélange résultant devrait gagner en cohésion, et par conséquent en résistance mécanique.

II- EVALUATION BIOLOGIQUE

Avant de perfectionner la formule de ce COPC, nous avons préféré réaliser des tests préliminaires de biocompatibilité.

Bien que les sels de phosphate de calcium soit admirablement bien tolérés par l'organisme [69], notre produit est innovant par sa phase liquide.

Le COPC se transforme dans l'organisme ; aussi la biocompatibilité de ce matériau et ses produits de transformation ou de dégradation doit être prouvée à court, moyen et long terme. Il y a donc lieu de réaliser des essais *in vivo* et *in vitro* comme pour tout dispositif implantable. Pour cela nous avons suivi les tests *in vivo* et *in vitro* recommandés pour les dispositifs implantables non-actifs.

Les résines acryliques (PMMA) sont largement utilisées depuis les années 1960 en cimentation et en comblement. Le PMMA sera utilisé comme référence pour constituer des éprouvettes. Leur toxicité est souvent due à un phénomène de vieillissement et de prise en charge des débris par le système macrophagique. Il nous a donc semblé intéressant d'utiliser des cultures de macrophages pour tester la cytotoxicité du COPC.

En contact direct, le COPC semble toxique : seules 15% des cellules sont vivantes en fin de culture. Pour expliquer ce résultat qui semble discordant avec l'excellente tolérance intra-péritonéale chez la souris, nous nous sommes aidés d'analyse en microscopie électronique à transmission sur les cultures. Lors de la préparation des extraits, nous sommes frappés par l'aspect louche et trouble du liquide d'extraction. Cet aspect se reproduit très rapidement après mise au contact de l'éprouvette avec le milieu de culture. Nous pensons que le mécanisme de toxicité du produit est dû à une asphyxie de notre culture par la suspension que constitue le milieu lui-même. Un autre mécanisme pourrait être évoqué. Les analyses en microscopie électronique à transmission nous montrent des cellules très altérées avec à l'intérieur de nombreux cristaux effilés de grande taille.

Ces cristaux ont un aspect comparable à ceux de l'hydroxyapatite et semblent être phagocytés par les macrophages. L'abondance de ces aiguilles peut expliquer la faible quantité de cellules vivantes restantes. Les macrophages essaient de les phagocyter en grande quantité et meurent.

Le poids même de l'éprouvette sur le tapis de cellules en culture n'a pas d'influence sur la mortalité cellulaire car pour le témoin négatif, 100% des cellules sont survivantes. On pourra noter que curieusement le PMMA choisi comme témoin entraîne une destruction de 35% des cellules. On peut donc en déduire que le PMMA présente un potentiel faiblement toxique sur les cellules macrophagiques même sous forme massive.

En contact d'extrait, le milieu incubé seul dans les conditions d'extraction stimule la culture cellulaire. L'extrait à 100% est toxique à des taux qui approchent ceux du contact direct. A 50% cette toxicité diminue pour disparaître à 10% et même stimuler la culture à la manière du milieu incubé seul. Le mécanisme de toxicité étant dépendant de la dilution de l'extrait, nos hypothèses précédentes restent valides : soit asphyxie des cultures, soit toxicité des cristaux "en aiguilles" sur les macrophages qui tentent de les phagocyter. Pour essayer de départager ces hypothèses il serait intéressant de réaliser d'autres types de cultures cellulaires avec des cellules autres que les macrophages, n'ayant pas de potentiel de phagocytose.

Les produits ont été étudiés sous forme massive. Or, on connaît la toxicité des débris d'usure du PMMA. Il conviendrait de réaliser des études de cytotoxicité et des études de tolérance *in vivo* sur des formes particulières. Des essais sont en cours pour tenter de reproduire les particules d'usure du PMMA aussi bien par leur taille que leur forme, ces deux facteurs influant sur la biocompatibilité.

A partir des études *in vivo*, nous avons essayé de démontrer la non-toxicité du produit. Le produit n'est pas toxique en injection intrapéritonéale chez la souris et ne déclenche pas de phénomène d'intolérance en injection intra-dermique chez le lapin.

On peut donc admettre que le produit n'est pas toxique.

Il y a toujours un biais d'extrapoler à l'homme des résultats obtenus chez l'animal. Prenons l'exemple du "maximization test" de Magnusson et Kligman [49].

Les cobayes se sensibilisent beaucoup moins facilement que l'homme. Mais toute substance qui déclenche des réactions d'hypersensibilité retardée chez le cobaye induira une réaction positive chez l'homme. Il est évidemment préférable d'utiliser des animaux pour un premier screening. De nombreuses études ont été réalisées pour sensibiliser ce test [49]. Il semble que la sensibilisation par voie intradermique combinée à de l'adjuvant de Freund suivie d'applications topiques sous pansements occlusifs donne les meilleurs résultats.

Dans notre étude, aucun cobaye ne montre de signes d'hypersensibilité retardée. Les doses utilisées pour essayer de déclencher l'allergie sont énormes (extrait à 100%) et s'il n'existe aucune réaction chez le cobaye, le potentiel allergisant est très bas. Néanmoins, on ne peut en déduire que le COPC ne sensibilisera jamais personne mais plutôt que son potentiel sensibilisant est très faible. Ceci nous est confirmé par nos implantations intra-musculaires : aucune réaction de sensibilisation systémique n'a été notée ; sur les coupes histologiques, la quantité de polynucléaires éosinophiles et de lymphocytes retrouvés est infime. Lors de l'implantation d'un matériau sensibilisant, la quantité de polynucléaires éosinophiles, lymphocytes et macrophages serait supérieure.

En implantation intramusculaire, la zone réactionnelle péri-implantaire est constituée d'une couche fibreuse, association de fibroblastes et de collagène sans signe de nécrose tissulaire étendue. L'épaisseur de la couche de fibrose diminue avec le temps ce qui signifie la bonne tolérance du produit. Les résultats sont superposables pour le témoin (PMMA) et pour le COPC. Néanmoins on retrouve une couche cellulaire de type fibroblastique qui adhère intimement à la surface du COPC. En effet lors d'artéfacts de préparation, le plan de clivage se situe au milieu de la couche fibreuse en laissant une couche cellulaire fortement adhérente au COPC. Cela permet aux cellules de pénétrer et de réhabiter les cavités accessibles à partir de la surface dans un processus d'assimilation du produit. Au cours des semaines, ce phénomène s'accroît avec même pénétration vasculaire. Des images de couches cellulaires adhérentes n'ont jamais été remarquées pour le PMMA.

Il est important d'être prudent vis à vis de ce témoin : en effet nos blocs étant inclus en paraffine, nous avons été obligés pour des facilités de coupe d'enlever les échantillons de PMMA. Sur les lames on ne voit aucune lésion de dilacération ni d'arrachement ; la couche fibreuse au contact de l'implant enlevé semble intacte. Le fait d'avoir enlevé l'échantillon n'a à priori aucune incidence sur l'analyse histologique.

La réaction observée est une réaction typique à une agression chirurgicale, non spécifique des échantillons. Elle présente un temps de régénération musculaire aspécifique. Mais les termes auxquels sont observés les échantillons sont trop précoces pour être véritablement spécifiques du matériau implanté ; dans un prochain travail nous implanterons à moyen et long terme.

De même sur les études de l'implantation intra-osseuse, nous nous sommes heurtés à des problèmes de coupe du PMMA. Nous avons pu les résoudre en dissolvant le PMMA dans de l'alcool méthylique.

Grâce à ce procédé, nous avons pu mettre en évidence une réaction de type inflammatoire en périphérie de l'échantillon. Des cellules géantes multinucléées tapissent la surface de l'échantillon, elles ne sont pas spumeuses : elles peuvent correspondre à une réaction à corps étranger sans possibilité de phagocytose du produit. Il est à remarquer qu'on n'observe aucune construction osseuse en périphérie de l'implant, quel que soit le terme.

Nous avons constaté la présence de travées au contact du COPC. Certaines semblent érodées au contact du produit, d'autres ont manifestement incorporé du produit avec présence de ce matériel hétérogène dans la travée. Celle-ci étant séparée du reste de l'os par une ligne cimentante, il s'agit d'os nouvellement formé. L'aspect érodé du produit pourrait avoir plusieurs origines : soit l'os abimé lors de la pose de l'implant se répare jusqu'au contact du produit, soit l'os est en train d'incorporer le produit, soit par un mécanisme de dissolution reprecipitation des cristaux se sont déposés à la surface de l'os.

Ces travées ne peuvent correspondre à des travées repoussées et leur aspect n'est pas compatible avec une néoostéogenèse provoquée par des copeaux apportés par la mèche.

Sur les explantations à 6 semaines, l'os est retrouvé en périphérie de l'échantillon directement au contact ou avec interposition de cellules géantes multinucléées ou d'une couche de tissu conjonctif fibreux.

Le produit est donc bien toléré dans l'os. Celui-ci est même capable de repousser à son contact soit directement, soit avec interposition de tissu conjonctif. Le produit semble dans quelques plages participer à une néoostéogenèse (incorporation à des travées nouvellement formées). La grande proportion de cellules géantes histiocytaires puis d'histiocytes spumeux montre la capacité de l'organisme à résorber le produit. Des explantations encore plus tardives permettraient aussi d'évaluer la cinétique de réhabilitation, le mode de vieillissement du COPC dans l'organisme.

E - CONCLUSION

Au terme de cette étude expérimentale, nous avons commencé à mettre au point une nouvelle formulation d'un ciment osseux de type phosphocalcique innovant par sa phase liquide. Ce ciment ne peut servir en l'état de "colle biologique".

Ce travail ne représente qu'une étude préliminaire de formulation et de tolérance biologique. Néanmoins, ce produit nous semble, par plusieurs propriétés, intéressant. D'abord, de par son comportement physique : il présente une phase initiale très fluide ce qui lui permet d'être injecté à la seringue et de pénétrer les moindres interstices pour un remplissage "maximum". Cette phase d'1 à 2 min est suivie d'une phase plastique de 3 à 4 min, ce qui permet éventuellement de bloquer une prothèse à ancrage biologique. Dans ce type d'application, il ne semble pas nécessaire que le produit ait une grande résistance mécanique car la prothèse est conçue pour s'autobloquer dans le fût.

Sa composition chimique évolue avec le temps, la phase amorphe (le liant) disparaît au fur et à mesure que le produit vieillit après avoir participé à sa cohésion initiale. Grâce à la composition du COPC, l'os s'en sert de substrat pour sa repousse qui est ainsi favorisée car elle trouve *in situ* tous les éléments nécessaires.

Un autre des avantages du COPC est sa grande biocompatibilité. Celle-ci a bien été mise en évidence *in vivo*. Les tests *in vitro* sont à réenvisager avec de nouvelles lignées cellulaires. Les implantations intraosseuses sont très prometteuses avec la mise en évidence d'une ostéogenèse périphérique, un taux de réhabilitation très élevé : les cellules adhèrent intimement au produit et la moindre cavité accessible est réhabilitée. Sur certaines coupes on note même une intégration du COPC dans de l'os nouvellement formé.

Toutes ces constatations peuvent nous permettre d'envisager nombre de possibilités thérapeutiques, d'autant plus que le COPC pourra être associé avec des facteurs ostéoinductifs.

Comme inconvénient, on pourra opposer à ce ciment sa faible résistance mécanique. Celle-ci reste néanmoins supérieure aux ciments de ce type déjà expérimentés et est légèrement supérieure à celle de l'os spongieux. Le fait de rajouter un plastifiant biorésorbable semble bénéfique sur la tenue mécanique. Pour l'heure actuelle on peut proposer ce ciment en zone non portante. Mais d'autres recherches sur les phases liquides plastiques biorésorbables pourront certainement augmenter cette résistance, en association avec des techniques d'homogénéisation plus éprouvées pour le mélange des poudres.

La place exacte de ce ciment dans l'arsenal thérapeutique des chirurgiens reste encore à définir sur un produit dont la formulation va évoluer.

Actuellement il pourrait servir de comblement, de vecteur de biomolécules, à caler des prothèses sans ciment pour réaliser une interface active.

Le chapitre suivant correspond au développement de ces hypothèses en s'appuyant sur l'expérience d'autres équipes de travail.

AVENIR:

**quelles sont les applications biomédicales envisageables pour les
ciments osseux phosphocalciques?**

I-LE CIMENTAGE DES PROTHESES SANS CIMENT

Nous avons développé les problèmes rencontrés lors des arthroplasties notamment lors de l'utilisation du polyméthacrylate de méthyle.

L'incidence économique des descellements est énorme ainsi que les problèmes médico-chirurgicaux rencontrés lors des reprises.

Les prothèses sans ciment peuvent représenter une solution à ces inconvénients. Malgré leurs bons résultats, elles ne font pas encore l'unanimité. On leur reproche des migrations dans le fut diaphysaire, des douleurs post-opératoires. Ceci serait dû à un manque d'adaptation parfaite entre le fut fémoral et l'implant.

Une solution séduisante serait alors d'utiliser un ciment biorésorbable ostéoconductif. Il pourrait aussi être rendu ostéoinductif par l'adjonction de facteurs ostéogéniques. Par sa fluidité initiale le ciment peut pénétrer les interstices du spongieux. Après 2 min, il se solidifie et alors la prothèse pourrait être "calée" par le ciment. L'adaptation entre le fut et l'implant serait alors meilleure. On peut espérer ainsi diminuer les douleurs post-opératoires. L'avenir de ce ciment serait de disparaître pour laisser place à du tissu osseux et permettre réellement et de façon durable un contact intime entre l'os et la prothèse.

II- LA REPARATION OSSEUSE EN TRAUMATOLOGIE

Ces dernières années, nous avons vu se développer l'os "liquide" (SRS) de NORIAN .

Il s'agit d'un ciment à os biorésorbable, d'une bonne tenue mécanique capable de remplir un défaut osseux comme dans les fractures de poignet à bascule postérieure de type Pouteau-Colles. Après réduction de la fracture, les auteurs proposent une injection percutanée de ciment qui, prenant en masse *in situ* participe à la stabilisation immédiate du foyer.

Néanmoins cela ne dispense pas de l'immobilisation plâtrée post-opératoire dont la durée sera de 3 semaines (6 semaines sont habituellement préconisées par ces auteurs). Avec ce type de méthode, le risque de déplacement secondaire serait infime.

Actuellement est menée une étude multicentrique aux USA sur l'injection du SRS (Skeletal Repair System) dans les fractures de poignet de femmes jeunes. Leurs résultats à 1 an sont jugés comme bons sur la mobilité et la douleur.

Cette méthode pourrait être étendue par la suite à d'autres types de fractures, notamment les fractures des épiphyses qui présentent une forte impaction du spongieux. Certaines fractures du calcaneum pourraient aussi en bénéficier.

Ces ciments osseux pourraient aussi dans toute fracture comminutive servir à une fixation opératoire temporaire, aidant ainsi à la pose du matériel d'ostéosynthèse.

L'intérêt de ce ciment réside dans ses capacités ostéoconductives et dans le fait qu'il puisse servir de substrat à l'os pour sa repousse.

III- UNE ALTERNATIVE À LA GREFFE

En chirurgie tumorale, on se trouve souvent confronté au comblement de défauts osseux de taille et de forme variable.

Des comblements ont été réalisés en utilisant des céramiques phosphocalciques sous forme solide. On doit associer un matériel d'ostéosynthèse afin d'augmenter la stabilité primaire du montage.

L'équipe de Passuti et Daculsi à Nantes utilise une céramique biphasique appelée BCP (mélange de TCP et d'hydroxyapatite) pour favoriser la fusion vertébrale chez les enfants opérés de scoliose [65]. Ils associent le BCP à une ostéosynthèse rigide et ne l'utilisent que lorsque que le stock osseux disponible est défaillant quantitativement ou qualitativement (ostéogénèse imparfaite).

L'utilisation d'un ciment dans ce type d'application permettrait une plus grande maniabilité. Le remplissage pourrait être maximum, même en cas de cavités contournées ou difficiles d'accès. Un intérêt évident serait le remplissage de cavités laissées par le curetage d'un chondrome au niveau d'un doigt.

IV- GREFFE "EXPENDER"

Grundel [29] utilise une céramique poreuse biphasique sous forme de grains pour augmenter le volume des greffes. Il les combine à de la moëlle osseuse autogène.

La céramique a pour intérêt de rendre ce type de greffe plus maniable, de lui procurer une stabilité mécanique initiale ; elle accélère l'ostéogénèse.

L'intérêt des ciments osseux phosphocalciques serait de rendre ce mélange plus homogène et cohérent.

V- VECTEUR DE PRINCIPES ACTIFS

De nombreux systèmes de délivrement de principes actifs ont été utilisés.

Le Plâtre de Paris a été associé par Petrova à des antiseptiques (Kaolin et Rivanol) depuis 1928. En 1953, Lovacevic lui associe de la pénicilline et des sulfonamides, suivi par Mackey et Sulo en 1982 et 1993.

Le PMMA sert de support aux antibiotiques depuis 1972 [8]. L'antibiotique se libère par élution à partir de la surface du ciment. Des concentrations importantes sont retrouvées dans l'hématome périfracturaire, le sang pendant 2 jours et les urines pendant 3 semaines. En 1990 Downes étudie le relargage de l'hormone de croissance à partir du PMMA. Cette cinétique est retrouvée identique à celle des antibiotiques [19].

Depuis la découverte de facteurs ostéoinductifs dont la BMP, il est apparu essentiel de trouver le vecteur le plus approprié [14]. Celui-ci doit pouvoir protéger la BMP de la protéolyse non spécifique. L'association d'un vecteur permet d'accélérer la cinétique d'apparition de l'os par rapport à une implantation de BMP seule [38] [90]. Le challenge actuel est de trouver un système de délivrement qui offrirait une alternative aux greffes autogéniques d'os [46].

D'après Lucas [17], pour délivrer de façon optimale des protéines ostéoinductives il faut que :

- le relargage soit contrôlé,
- une quantité adéquate de facteur soit délivrée aux cellules inductibles,
- l'hôte croisse rapidement dans le vecteur,
- il soit biocompatible,
- l'implant soit résorbé et incorporé dans de l'os nouvellement formé,
- le vecteur ne soit pas exothermique.

De nombreux systèmes ont été testés. Parmi eux citons :

- collagène de type I (Cook) (Lucas),
- des protéines non collagéniques (Lindholm),
- des protéines non collagéniques insolubles (Urist),
- des copolymères d'acide lactique et glycolique (Urist),
- de la fibrine (Kawamura),
- du corail (Damien et Petat),
- des apatites greffées (Scharrock),

- des céramiques (Dard),
- du TCP (Urist),
- de la matrice riche en acide γ carboxyglutamique (Sato et Urist),
- du plâtre de Paris (Yamezaki),
- des ciments phosphocalciques (Kamegai)....

Actuellement la BMP est au stade des études cliniques. Une étude multicentrique est en cours pour traiter l'ostéonécrose aseptique des têtes fémorales par injection de BMP après forage [52]. Les premiers tests chez le cochon sont concluants. On peut espérer étendre cette méthode aux métastases osseuses, aux tassements vertébraux avec angulation, aux processus d'ostéolyse localisée.

Johnson [34] [35] aux USA coordonne des études multicentriques sur l'intérêt de la BMP en tant que thérapeutique adjuvante dans le traitement des pseudarthroses et des défauts osseux rebelles. Le vecteur est de l'os AAA. En 1986, Urist publie un cas clinique où un défaut laissé par l'exérèse d'un chondrome à un doigt est comblé avec succès par une capsule de gélatine combinée à de la BMP [87].

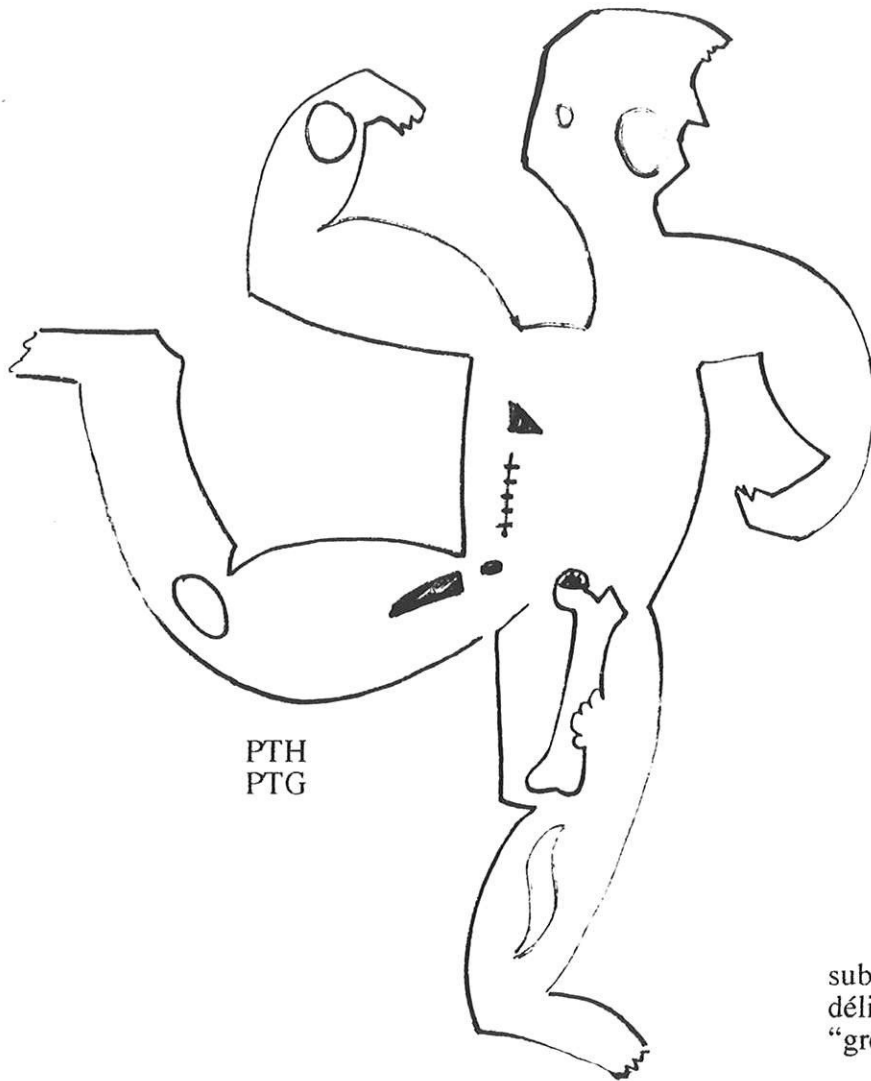
La multiplicité des systèmes testés montre qu'aucun n'apporte totale satisfaction. Pour Kamegai [38], la fibrine humaine est un système physiologique mais qui manque de tenue mécanique. Le plâtre de Paris a une prise exothermique et la calcémie aurait une influence (variable selon les auteurs) sur sa résorption ce qui représente un inconvénient. Les ciments phosphocalcique seraient de bons vecteurs. Urist [86] en justifie l'utilisation. Le système de délivrement naturel des BPM est la matrice osseuse extracellulaire qui est imprégnée de phosphate de calcium apatitique. Kawamura et Urist [39] [88] observent que dans des systèmes tels que les copolymères, le TCP et les hydroxyapatites poreuses, la résorption est incomplète. Pour ces auteurs, la persistance dans le défaut osseux serait comme un obstacle à la réparation.

Le COPC pourrait donc servir de vecteur pour les BMP.

Chauveaux [5] place aussi de grands espoirs dans la BMP pour réparer les pertes de substance osseuse quelque soit leur origine, régénérer un foyer de nécrose comme dans les ostéonécroses aseptiques des têtes fémorales, diminuer le temps nécessaire à la consolidation d'une fracture et diminuer les pseudarthroses.

D'autres applications peuvent être envisagées comme l'ancrage périprothétique en favorisant l'ostéogénèse périphérique, le traitement des maladies métaboliques osseuses comme l'ostéoporose.

En conclusion de ce chapitre, la figure suivante peut résumer les applications envisagées pour le COPC.



Chirurgie odontologique
Chirurgie maxillofaciale

comblement, réparations

Chirurgie ORL

réfection d'osselets

Chirurgie orthopédique
Traumatologie

fractures de poignet
tassements vertébraux
scolioses

ONA
ostéolyse localisée

substitut osseux
délivrement de BMP
"greffe expender"

CONCLUSION

Les ciments osseux de type phosphocalcique se développent. A moyen terme, ils feront partie de notre arsenal thérapeutique.

Au terme de ce travail nous avons commencé des recherches sur un ciment de type phosphocalcique, à prise hydraulique dans le système β TCP-MCPM innovant par sa phase liquide et l'association de ses régulateurs du durcissement.

Les tests de biocompatibilité sont en accord avec les données de la littérature sur l'inocuité des sels de phosphate de calcium. Ce type de produit ne peut à lui seul résoudre tous les problèmes de comblement et autres rencontrés lors de la chirurgie.

Des études futures vont permettre de mieux connaître la cinétique de résorption de ce produit, essayer d'améliorer ses propriétés mécaniques.

Mais la voie de recherche la plus intéressante est la combinaison, dans toutes les applications thérapeutiques envisagées, du COPC avec les protéines de croissance osseuse telles que les BMP.

Ce produit dans sa forme finale pourrait offrir des possibilités nouvelles et ainsi participer à l'arsenal thérapeutique du chirurgien.

BIBLIOGRAPHIE

1-BERMUDEZ O., BOLTONG M.G., DRIESSENS F.M.C., GINEBRA M.P., FERNANDEZ E., PLANELL J.A. - Chloride- and alkali- containing calcium phosphates as basic materials to prepare calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1994, **15**, 12, 1019-1023.

2-BERMUDEZ O., BOLTONG M.G., DRIESSENS F.M.C., PLANELL J.A. - Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium-orthophosphate cements: a pilot study. *Journal of Materials Science : Mater.in Medecine*, 1993, **4**, 389-393.

3-BERMUDEZ O., BOLTONG M.G., DRIESSENS F.M.C., PLANELL J.A. - Developement of an octacalcium phosphate cement. *Journal of Materials Science : Mater.in Medecine*, 1994, **5**, 144-146.

4-BERMUDEZ O., BOLTONG M.G., DRIESSENS F.M.C., PLANELL J.A. - Development of some calcium phosphate cements from combination of α -TCP, MCPM and CaO. *Journal of Materials Science : Mater.in Medecine*, 1994, **5**, 160-163.

5-BIOMAT , GESTO - Protéines adjuvantes de l'ostéogénèse (BMPs) et reconstruction osseuse. Résumés. *Congrès du 15-16 juin 1995* , Bordeaux.

6-BOUTIN P. - Arthroplastie totale de la hanche par prothèse en alumine frittée. *Rev.Chir. Ortho.*, 1972, **58**,229-246.

7-BRUCHEL F.-F., DRUCKER D., JASTY M., JIRANEK W., HARRIS W.-H. - Osteolysis around uncemented acetabular component of cobalt chrome surface replacement total hip arthroplasty. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1994, **298**, 202-211.

8-BUCHHOLZ H.W., ELSON R.A., HEINERT K. - Antibiotic-loaded Acrylic Cement : Current Concepts. *Clin. Orthop.and Related Res.*, 1984, **190**, 96-108.

9-CARMICHAEL - Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemiosensitivity testing. *Cancer Res.* , 1987, **47**, 936-942.

10-CHARNLEY J. - Anchorage of the femoral lead. In: Prothesis to the shaft of the femur. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1960,**42 B**,28-30.

11-CHASE S.W., HERNDON C.H. - The Fate of Autogenous and Homogenous Bone Grafts. A Historical Review. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1955, **37 A**, 4, 809-841.

12-CONORT O., STOCCO J., BENMAOR K., EVRARD J., HAZEBROUCQ G. - Linguettes de plâtre aux antibiotiques: fabrication, contrôles, applications en orthopédie. *Act. Pharm. Biol. Clin.*, 1987, **4**, 527-530.

13-CONSTANTZ B.R., ISON I.C., FULMER M.T., POSER R.D., SMITH S.T., VANWAGONER M., ROSS J., GOLDSTEIN S.A., JUPITER J.B., ROSENTHAL D.I. - Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*, 1995, **267**, 1796-1799.

14-COOK S.D., BAFFES G.C., WOLFE M.W., SAMPATH T.K., RUEGER D.C. - Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 Induces Healing in a Canine Long-Bone Segmental Defect Model. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1994, **301**, 302-312.

15-COOK S.D., WOLFE M.W., SALKELD S.L., RUEGER D.C. - Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Segmental Defects in Non-Human Primates. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1995,**77 A**, 5, 734-750.

16-DACULSI G., LEGEROS R.Z., HEUGHEBAERT M., BARBIEUX I. - Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue Inter.* 1990, **46**, 20-27.

17-DAMIEN C.J., PARSONS J.R. - Bone Graft and Bone Graft Substitutes : A Review of Current Technology and Applications. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991, **2**, 187-208.

18-DANDURAND J., DELPECH V., LEBUGLE A., LAMURE A., LACABANNE C. - Study of the mineral-organic linkage in an apatitic reinforced bone cement. *Journ. of Biomedical Mater Res.*, 1990, **24**, 1377-1384.

19-DOWNES S., WOOD D.J., MALCOLM A.J., PATH M.R.C., ALI S.Y. - Growth Hormon in Polymethylmethacrylate Cement. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1990, **252**, 294-298.

20-DUPARC J., HUTEN D., CAVAGNA R. - Prothèses totales de hanche vues par le chirurgien. In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives, collection de pathologie locomotrice* n°15, Editions Masson, 1988, 60-73.

21-DRIESENS F.C.M. - Chemistry of calcium phosphate cements. In : *Fourth Euro Ceramics*, 1995, **8**, 77-83.

22-DRIESENS F.M.C., BOLTONG M.G., BERMUDEZ O., PLANELL J.A., GINEBRA M.P., FERNANDEZ E. - Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science : Mater. in Medecine*, 1994, **5**, 164-170.

23-EINHORN T. A. - Current Concepts Review, Enhancement of Fracture Healing . *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1995, **77 A**, 940-956.

24-FRAYSSINET P., AUTEFAGE A., BONNEVIALLE P., ROUQUET N., GUILHEM A., MANSAT M. - Etude expérimentale du comblement d'une perte de substance osseuse par céramique phosphocalcique et greffe circulaire en culture. *Rev. Chir. Ortho. 65° réunion annuelle de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique* , 1991, **77**, suppl.n°1,150-151.

25-FUKASE Y., EANES E.D., TAKAGI S., CHOW L.C., BROWN W.E. - Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. *J. Dent. Res.*, 1990, December, **69**, 12, 1852-1856.

26- GARCIA-CIMBRELO E., MUNUERA L. - Early and Late Loosening of the Acetabular Cup After Low-Friction Arthroplastie. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1992,**74 A**, 8, 1119-1129.

27-GESTO - Les Substituts Osseux en 1994. *Monographie éditée par le GESTO* , 1994.

28-GOUIN F., DELECRIN J., PASSUTI N., BAINVEL J.V. - Céramiques en phosphate de calcium, cinétique de réhabilitation et applications cliniques. *International Symposium Lyon , La prothèse totale de hanche de Charnley, 33 ans d'expérience mondiale* , 1995, **13**, 335-339.

29-GRUNDEL R. E., CHAPMAN M. W., YEE T., MOORE D.C. - Autogenic Bone Marrow and Porous Biphasic Calcium Phosphate Ceramic for Segmental Bone Defects in the Canine Ulna . *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1991, **266**, 244-258.

30-HANFT J.R., SPRINKLE R.W., SURPRENANT M.S., WERD M.B. - Implantable bone substitute materials. *Clinics in podiatric medicine and surgery* , 1995, **12**, n° 3 , 437-455.

31-HOOGENDOORN H.A., RENOOIJ W., AKKERMANS L.M.A., VISSER W., WITTEBOL P. - Long-term Study of Large Ceramic Implants (Porous Hydroxyapatite) in Dog Femora. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1984, **187**, 281-288.

32-JARCHO M. J. - Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1981, **157**, 259-278.

33-JIRANEK W.- A., MACHADO M., JASTY M., JEVSEVAR D., WOLFE H.-J., GOLDRING S.-R., GOLDBERG M.-J., HARRIS W.-H. - Production of cytokines around loosened cemented acetabular component. *Journ of Bone and Joint Surg.* , 1993, **75 a**, 6, 863-879.

34-JOHNSON E.E., URIST M.R., FINERMAN G.A. - Repair of Segmental Defects of the Tibia with Cancellous Bone Grafts Augmented with Human Bone Morphogenetic Protein . A Preliminary Report. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1988, **236**, 249-257.

35-JOHNSON E.E., URIST M.R., FINERMAN G.A. - Resistant Nonunions and Partial or Complete Segmental Defects of Long Bones. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1992, **277**, 229-237.

36-JORTIKKA L., MARTTINEN A., LINHOLM T.S. - Partially Purified Reindeer (*Rangifer Tarandus*) Bone Morphogenic Protein Has a High Bone-Forming Activity Compared With Some Other Artiodactyls. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1993, **297**, 33-37.

37-JUDET J., JUDET R. - The use of an artificial head for arthroplasty of the hip joint. *Journ.of Bone and Joint Surg.* , 1950, **32 B**, 166-173.

- 38**-KAMEGAI A., SHIMAMURA N., NAITOU K., NAGAHARA K., KANEMATSU N., MORI M. - Bone Formation under the Influence of Bone Morphogenetic Protein / Self-Setting Apatite Cement Composite as a Delivery System. *Bio-Medical Materials and Engineering* , 1994, **4**, n° 4, 291-307.
- 39**-KAWAMURA M., URIST M.R. - Human Fibrin Is a Physiologic Delivery System for Bone Morphogenetic Protein. *Clin. Orthop. and Related Res.*, 1988, **235**, 302-310.
- 40**-KEMPF I. - Pourquoi je cimente? In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives, collection de pathologie locomotrice* n°15, Editions Masson, 1988, 11-15.
- 41**-KOKUBO T. - Bioactive glass ceramics : properties and applications. *Biomaterials* , 1991,**12**, 155-163.
- 42**-KRUSE P.F.J.R., PATTERSON K.M. - Tissue culture methods and applications. *Academic Press* , 1973, New York
- 43**-KURASHINA K., KURITA H., HIRANO M., DE BLIECK J.M.A., KLEIN C.P.A.T., DE GROOT K. - Calcium phosphate cement : *in vitro* and *in vivo* studies of the α -tricalcium phosphate - dicalcium phosphate dibasic - tetracalcium phosphate monoxide system. *Journ. of Materials Science: Mater. in Medecine*, 1995, **6**, 340-347.
- 44**-LANGLAIS F., BENKALFATE T., THOMAZEAU H., ABOUD A., LAUCIEN G., CHAUVEL J. J. -Descellements fémoraux de prothèses totales de hanche par pseudarthrose de trochantérotomies. *Rev. Chir. Ortho.*, 1995, **82**, n°2,95-106.
- 45**-LEMAITRE J., MIRTCHI A., MORTIER A. - Calcium phosphate cement for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels*, 1987, **9-10**, 141-146.
- 46**-LINDHOLM T.C., LINDHOLM T.S., MARTTINEN A., URIST M.R.- Bovine Bone Morphogenetic Protein (bBMP/NCP)- Induced Repair of Skull Trephine Defects in Pigs. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1994, **301**, 263-270.

- 47-LORD G., MAROTTE J.-H., BLANCHARD J.-P., GUILLAMOU J.-L.** - Pour des arthroplasties totales sans ciment. In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives, collection de pathologie locomotrice n°15, Editions Masson, 1988, 16-29.*
- 48-MACKEY D., VARLET A., DEBEAUMONT D.** - Antibiotic Loaded Plaster of Paris Pellets. *Clin. Orthop. and Related Res.*, 1982, **167**, 263-268.
- 49-MAGNUSSON B., KLIGMAN A.M.** - The identification of contact allergens by animal assay, the guinea pig maximization test. *Journ. of Investig. Derm.* , 1969, **52**, n° 3, 268-276.
- 50-MALONY W.J., PETERS P., ENGH C.A., CHANDLER H.** - Severe osteolysis of the pelvis in association with acetabular replacement without cement. *Journ. of Bone and Joint Surg.*, 1993, **75 a**, 11, 1627-1635.
- 51-MARIE P.** - Facteurs de croissance et tissu osseux. Implications dans la formation de la matrice osseuse. *Annales d'Endocrinologie* , 1994, **55**, 85-89.
- 52-MAZIERE B.** - La "Bone Morphogenetic Protein" (BMP) : un facteur de croissance prometteur en clinique ? *La Lettre du Rhumatologue* , 1995, **212**, 3-4 .
- 53-MIRTCHI A., LEMAITRE J., MUNTING E.** - Calcium phosphate cements : action of setting regulators on the properties of the β tricalcium phosphate - monocalcium phosphate cements. *Biomaterials*, 1989, **10**, 634-638.
- 54-MIRTCHI A., LEMAITRE J., TERANO N.** - Calcium phosphate cements: study of the β tricalcium phosphate - monocalcium phosphate system. *Biomaterials*, 1990, **10**, 475-480.
- 55-MOHAN S., BAYLINK D.J.** - Bone Growth Factors. *Clin. Orthop. and Related Res.*, 1991, **263**, 30-48.
- 56-MONMA H., MAKISHIMA A., MITOMO M., IKEGAMI T.** - Hydraulic properties of the tricalcium phosphate - dicalcium phosphate mixture. *Nippon Seramikkusu Gakujutsu Ronbunshi* , 1988, **96**, 8, 878-880.

57-MOSMAN T. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55-63.

58-NISHMURA N., YAMAMURO T., TAGUCHI Y., IKENAGA M., NAKAMURA T., KOKUBO T., YOSHIHARA S. - A new bioactive bone cement : its histological and mechanical characterization. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991, **2**, 219-229.

59-Norian SRS For Colles' Fractures Equal to, Better than Standard Treatment. *Orthopaedics International Edition July / August 1996*, **4** , N° 4, 237-238.

60-OLIVIER H. -Traitement des détériorations cotyloïdiennes aseptiques des prothèses totales de hanche. In : *Conférences d'enseignement SOFCOT, Paris Expansion Scientifique Française*, 1995, 23-34.

61-OTSUKA M., MATSUDA Y., SUWA Y., FOX J.L., HIGUCHI W.I. - Effect of particle size of metastable calcium phosphates on mechanical strength of a novel self-setting bioactive calcium phosphate cement. *Journ. of Biomedical Mater. Res.* , 1995, **29**, 25-32.

62-ONO K., YAMAMURO T., NAKAMURA T. - Mechanical properties of bone after implantation of apatite-wollastonite containing glass ceramic-fibrin mixture. *Journ. of Biomedical Mater Res.* , 1990, **24**, 47-63.

63-OONISHI H. - Orthopaedic applications of hydroxyapatite. *Biomaterials* , 1991, **12**,171-178.

64-PALEY D., YOUNG M.C., WILEY A.M., FORNASIER V.L., JACKSON R.W. - Percutaneous Bone Marrow Grafting of Fractures and Bony Defects. An Experimental Study in Rabbits. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1986, **208**, 300-312.

65-PASSUTI N., DACULSI G., ROGEZ J.M., MARTIN S., BAINVEL J.V. - Macroporous Calcium Phosphate Ceramic Performance in Human Spine Fusion. *Clinical Orthop. and Related Res.*, 1989, **248**, 169-176.

66-PELTIER L.F., JONES R.H. - Treatment of Unicameral Bone Cysts by Curettage and Packing with Plaster-of-Paris Pellets. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1978,**60** A, 6, 820-822.

67-PIETERS - Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet*, 1991, **338**, 399-403.

68-REY C. - Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier : l'hydroxyapatite. *L'actualité chimique*, 1995, **décembre**, 41-45.

69-REY C., HINA A., AMRAH-BOUALI S., RANZ X. - Surface reactions of calcium-phosphate bioceramics, comparison with bone mineral surface chemistry. In: *Fourth Euro Ceramics*, 1995, **8**, 301-312.

70-ROY CAMILLE R., SAILLANT G., LAZENNEC J.-Y. - Prothèses totales de hanche avec ou sans ciment ? In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives, collection de pathologie locomotrice n° 15*, Editions Masson, 1988, 30-35.

71-SAITO M. , MARUOKA A., MORI T., SUGANO N., HINO K. - Experimental studies on a new bioactive bone cement : hydroxyapatite composite resin. *Biomaterials* , 1994, **15**, 2, 156-160.

72-SCHMALZRIED T. -P., JASTY N., HARRIS W.-H. - Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of effective joint space. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1992, **74 A** 6, 849-863.

73-SEDEL L. - Les biomatériaux de prothèses. In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives. Collection de pathologie locomotrice n° 15*, Editions Masson, 1988, 1-10.

74-SENAHA Y., NAKAMURA T., TAMURA J., KAWANABE K., IIDA H., YAMAMURO T. - Intercalary replacement of canine femora using a new bioactive bone cement. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1996, **78 B**, 1, 26-31.

75-STAUFFER R.N. - Ten-Year Follow-up Study of Total Hip Replacement. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1982, **64 A**, 7, 983-990.

76-SULO I. - Granules de plâtre à la gentalline dans le traitement de l'infection osseuse. *Rev. Chir. Ortho.*, 1993, **79**, 299-305.

77-TAGUCHI Y., YAMAMURO T., NAKAMURA T., NISHIMURA N., KOKUBO T., TAKATA E., YOSHIHARA S. - A Bioactive Glass Powder-Ammonium Hydrogen Phosphate Composite for Repairing Bone Defects. *Journal of Applied Biomaterials*, 1990, **1**, 217-223.

78-TAITSMAN J.P., SAHA S. - Tensile Strength of Wire-Reinforced Bone Cement and Twisted Stainless-Steel Wire. *Journ. of Bone and Joint Surg.*, 1977, **59 A**, 3, 419-425.

79-TAKAGI K., URIST M.R. - The Role of Bone Marrow in Bone Morphogenetic Protein-induced Repair of Femoral Massive Diaphyseal Defects. *Clinical Orthop. and Related Res.*, 1982, **171**, 224-231.

80-TOMENO B., COURPIED J.P., LOTY B. - Techniques et indications des greffes et transplantations osseuses et ostéocartilagineuses. *EMC Techniques Chirurgicales Orthopédie*, 1988, **11**, **44030**, 1-16.

81-TRANQUILLI LEALI P., MEROLLI A. - In-vivo evaluation of bioceramics. In: *Fourth Euro Ceramics*, 1995, **8**, 11-18.

82-TRECANT M., DELECRIN J., NGUYEN J.M., ROYER J., PASSUTI N., DACULSI G. - Influence of post-implantation physico-chemical changes in macroporous ceramic on its mechanical strength. *Journ. of Materials Science: Mater. in Medicine* 1996, **7**: 227-229.

83-TRECANT M., DELECRIN J., ROYER J., GOYENVALLE E., DACULSI G. - Mechanical changes in macroporous calcium phosphate ceramics after implantation in bone. *Clinical Mater.*, 1994, **15**, 233-240.

84-URIST M.R. - Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 1965, **150**, 893-899.

85-URIST M.R., DELANGE R.J., FINERMAN G.A.M. - Bone Cell Differentiation and Growth Factors. *Science*, 1983, **220**, 680-686.

86-URIST M.R., HUO Y.K., BROWNELL A.G., HOHL W.M., BUYSKE J., LIETZE A., TEMPST P., HUNKAPILLER M., DELANGE R.G. - Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatographie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 371-375.

87-URIST M.R., KOVACS S., YATES K.A. - Regeneration of an enchondroma defect under the influence of an implant of human bone morphogenetic protein. *Journ. Hand Surg.* , 1986, **11A**, 3, 417-419.

88-URIST M.R., LIETZE A., DAWSON E. - β -tricalcium Phosphate Delivery System for Bone Morphogenetic Protein. *Clinical Orthop. and Related Res.* , 1984, **187**, 277-280.

89-URIST M.R., LIETZE A., MIZUTANI H., TAKAGI K., TRIFFITH J.T., AMSTUTZ J., DELANGE R., TERMINE J., FINERMAN G.A.M. - A Bovine Low Molecular Weight Bone Morphogenetic Protein (BMP) Fraction. *Clin. Orthop. and Related Res.*, 1982, **162**, 219-232.

90-URIST M.R., NILSSON O., RASMUSSEN J., HIROTA W., LOVELL T., SCHMALZREID T., FINERMANN G.A.M. - Bone Regeneration under the Influence of a Bone Morphogenetic Protein (BMP) Beta Tricalcium Phosphate (TCP) Composite in Skull Trephine Defects in Dogs. *Clin. Orthop. and Related Res.*, 1987, **214**, 295-304.

91- UCHIDA A., ARAKI N., SHINTO Y., YOSHIKAWA H., KURISAKI E., ONO K. - The Use of Calcium Hydroxyapatite Ceramic in Bone Tumor Surgery. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1990, **72 B**, 298-302.

92-VICHARD Ph. , PEM R. - Le descellement aseptique des prothèses articulaires du membre inférieur. *Rev. Chir. Ortho.*,1972, **58**, 247-256.

93-VIDAL J., MAURY Ph. - Evolution et transformation des prothèses totales de hanche. In: *Prothèses de hanche et de genou: Actualités et perspectives, collection de pathologie locomotrice* n°15, Editions Masson, 1988,52-60.

94-VIDALAIN J.P. - Les revêtements d'hydroxyapatite... 10 ans après: certitudes, interrogations, avenir. *International Symposium Lyon , La prothèse totale de hanche de Charnley. 33 ans d'expérience mondiale* , 1995, **12**, 307-311.

95-VOLKOV M. - Allotransplantation of joints. *Journ. of Bone and Joint Surg.* , 1970, **52 B**, 1, 49-53.

96-WILLERT H. G., BERTRAM H., BUCHHORN G.-H. - Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: the role of bone cement fragmentation. *Clin. Orthop.and Related Res.*, 1990, **258**, 108-121.

97-WILLIAMS R.P., Mc QUEEN D.A. - A histopathologic study of late aseptic loosening of cemented total hip prostheses. *Clin. Orthop.and Related Res.*, 1992, **275**, 174-179.

98-YASKO A.W., LANE J.M., FELLINGER E.J., ROSEN V., WOZNEY J.M., WANG E.A. - The Healing of Segmental Bone Defects, Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (rh BMP-2). *Journ. of Bone and Joint Surg.*, 1992,**74 A**, 5, 659-670.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. LES RESINES ACRYLIQUES	17
II. LES GREFFES OSSEUSES	20
1. Historique	20
2. Les différents types de greffe osseuse	22
3. Les substituts	23
III. LES CIMENTS OSSEUX PHOSPHOCALCIQUES	25
1. Introduction	25
2. Ciments à base de phosphate tétracalcique	25
3. Ciments à base de β phosphate tricalcique	26
4. Ciments à base de α phosphate tricalcique	27
5. Ciments à base de verres bioactifs	28
ETUDE EXPERIMENTALE	30
A . INTRODUCTION	31
B . MATERIEL ET METHODES	32
I. FORMULATION	32
II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE	33
1. Constituants minéraux de départ	33
2. Produit fini : le COPC	34
2.1. Analyse en microscopie électronique à balayage	
2.2. Analyse par diffraction X	
III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES	34
IV. ETUDE BIOLOGIQUE	35
1. Etudes <i>in vitro</i> de la cytotoxicité	35
1.1. Contacts d'extraits	36
1.1.1. Milieu de culture des macrophages	

1.1.2. Mode de prélèvement des macrophages	
1.1.3. Protocole opératoire	
1.2. Contact direct	37
1.2.1. Milieu de culture et prélèvement des macrophages	
1.2.2. Protocole opératoire	
2. Etudes <i>in vivo</i>	38
2.1. Essais immunotoxicologiques	38
2.1.1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC	
2.1.2. Recherche des signes d'intolérance au COPC	
2.1.3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC	
2.2. Implantations chez l'animal	41
2.2.1. Implantations en intramusculaire	
2.2.2. Implantations en intraosseux	
C . RESULTATS	43
I. FORMULATION	43
II. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE	43
1. Constituants minéraux de départ	43
2. Produit fini : le COPC	46
2.1. Analyse en microscopie électronique à balayage	
2.2. Analyse par diffraction X	
III. ETUDE DES PROPRIETES MECANIQUES	52
IV. ETUDE BIOLOGIQUE	52
1. Etudes <i>in vitro</i> de la cytotoxicité	52
1.1. Contacts d'extraits	
1.2. Contact direct	
2. Etudes <i>in vivo</i>	54
2.1. Essais immunotoxicologiques	54
2.1.1. Recherche de la toxicité générale aiguë du COPC	
2.1.2. Recherche des signes d'intolérance au COPC	
2.1.3. Evaluation du pouvoir sensibilisant du COPC	
2.2. Implantations chez l'animal	55
2.2.1. Implantations en intramusculaire	
2.2.2. Implantations en intraosseux	

D . DISCUSSION	62
I. FORMULATION ET ETUDE PHYSICOCHIMIQUE	62
II. EVALUATION BIOLOGIQUE	64
E . CONCLUSION	68
AVENIR : quelles sont les applications biomédicales envisageables pour les ciments osseux phosphocalciques?	70
I. LE CIMENTAGE DES PROTHESES SANS CIMENT	71
II. LA REPARATION OSSEUSE EN TRAUMATOLOGIE	71
III. UNE ALTERNATIVE À LA GREFFE	72
IV. GREFFE EXPENDER	72
V. VECTEUR DE PRINCIPES ACTIFS	73
CONCLUSION	77
BIBLIOGRAPHIE	79
TABLE DES MATIERES	91

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devraient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession. honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 72

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Pour pallier aux inconvénients et du PPMA et des greffes osseuses, de nombreuses équipes travaillent sur les ciments osseux phosphocalciques biorésorbables. Ces produits permettent une ostéoconduction.

Nous avons mis au point et testé sur le plan de sa biocompatibilité un ciment osseux phosphocalcique appelé COPC.

Les premiers tests nous ont invité à réfléchir sur les applications cliniques potentielles d'un tel produit.

Mots clés :

- Ciments osseux
- Phosphocalcique
- Biorésorbabilité
- Bioconduction
- Biocompatibilité
- Bioinduction