



**HAL**  
open science

# Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse

Nathalie Ginsac

► **To cite this version:**

Nathalie Ginsac. Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse. Autre. INSA de Lyon, 2011. Français. NNT: 2011ISAL0020 . tel-00668698

**HAL Id: tel-00668698**

**<https://theses.hal.science/tel-00668698v1>**

Submitted on 10 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

# Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse

Présentée devant  
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Pour obtenir  
Le grade de docteur

École doctorale : École doctorale matériaux de Lyon  
Microstructure et comportement mécanique  
et macroscopique des matériaux-Génie des matériaux

Par  
Nathalie GINSAC  
Soutenue le 24 février 2011 devant la Commission d'examen

## Jury

---

Rapporteur	D. BERNACHE	Professeur (ENSM de Saint-Etienne)
Examineur	J.M. CHENAL	Docteur (INSA de Lyon)
Directeur	J. CHEVALIER	Professeur (INSA de Lyon)
Président	F. FARIZON	PU-PH (Université Jean Monnet, Saint-Etienne)
Directeur	D. HARTMANN	Professeur (Université Claude Bernard Lyon I)
Examineur	S. MEILLE	Docteur (INSA de Lyon)
Invité	E. PACARD	Docteur (Société Noraker)
Rapporteur	H. PETITE	Professeur (Université Paris Diderot)
Examineur	E. SAIZ	Professeur (Imperial College, Londres)

Laboratoires de recherche : MATEIS, UMR CNRS 5510, INSA de Lyon et RTI2B-UPSP  
2007-03-135, Université Claude Bernard, Université de Lyon



## Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans la contribution de nombreuses personnes que je tiens à remercier tout particulièrement.

Avant tout mes deux directeurs de thèse, Jérôme Chevalier, directeur du groupe Céramique et Composites du laboratoire MATEIS et Daniel Hartmann directeur du laboratoire RTI2B. A Jérôme, pour son dynamisme, ses encouragements, son soutien dans les moments difficiles, pour tout le temps qu'il m'a consacré malgré son emploi du temps chargé et toutes les connaissances qu'il m'a transmises sur les céramiques. A Daniel, pour sa confiance, son soutien, son optimisme et pour son aide dans le déroulement de toutes les études biologiques de ma thèse.

Ensuite, à mes encadrants INSA, Jean-Marc Chenal et Sylvain Meille. A Jean-Marc pour toutes les soirées qu'il m'a consacrées en manip et en rédaction, pour sa gentillesse et sa bonne humeur et enfin pour toutes les connaissances théoriques et expérimentales qu'il m'a transmises en sciences des polymères. A Sylvain pour sa gentillesse, sa bonne humeur, son soutien dans les moments difficiles et toutes les connaissances théoriques et expérimentales qu'il m'a apportées en mécanique.

Je remercie également Rachid Zenati, directeur de la société Noraker, sans lequel je n'aurais pas pu réaliser cette thèse Cifre, Elodie Pacard, pour son soutien lors de ma thèse et particulièrement au cours de la rédaction, Sandra Lasnier pour son aide et toutes les solutions qu'elle a changé pour moi !! et enfin Mickael Pulici pour tous les matériaux composites qu'il a élaboré pour moi !!! Je remercie Vanessa pour son aide administrative pendant toute ma thèse. Mais aussi Magali Berthebaud pour m'avoir apporté toutes ses connaissances en culture cellulaire lors de ma première année de thèse. Mais également toutes les autres personnes de la société Noraker.

Je souhaite remercier Marie-Eve Duclos, sans qui l'étude d'implantation n'aurait pu se faire, pour son amitié, sa bonne humeur, son dynamisme à toutes épreuves et son aide illimitée !

Je remercie également Sandra Balvay et Pascaline Rivory pour leur gentillesse, leur humour et tous les bons moments qu'on a passés ensemble en culture cellulaire et en histologie.

Je souhaite remercier le professeur Frédéric Farizon pour avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse, les professeurs Didier Bernache et Hervé Petite pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que le professeur Eduardo Saiz d'avoir accepté d'être un examinateur de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi au professeur Joël Courbon, directeur du laboratoire MATEIS pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire.

Je souhaite remercier le professeur Jean-Marc Pelletier, directeur de l'école doctorale Matériaux de Lyon, pour son amitié, sa joie de vivre et ses conseils avisés, mais aussi pour avoir partagé avec moi une passion commune, « mon commandant ».

Cette thèse a fait l'objet de nombreuses collaborations.

Je tiens à remercier le professeur Thierry Hamaide de m'avoir accueilli dans son laboratoire et Jean-Michel Lucas pour son aide et les connaissances qu'il m'a apporté en chromatographie.

Je souhaite remercier la société Novotec, et particulièrement, Martine Melin, pour son aide lors de la préparation des coupes histologiques et de leur interprétation.

Je remercie également les docteurs Georges Boivin et Lucien Frappart pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans l'interprétation des coupes histologiques.

Je remercie le professeur Eric Viguiier, mais aussi, Audrey Kavaguchi pour leur aide au cours de l'étude d'implantation.

Je souhaite également remercier le professeur Béatrice Burdin, pour son aide enrichissante dans la réalisation du protocole de fixation des cellules.

Au sein de l'INSA, de nombreuses personnes extérieures à ma thèse m'ont également beaucoup aidé

Je remercie Jérôme Adrien pour son aide, sa gentillesse, et ses conseils en tomographie.

Je souhaite remercier « Madame la présidente », Sandrine Cardinal, pour ses conseils d'experte en diffraction des rayons X.

Je remercie Alain Hector, Frédéric Godoy et Abdelkader Benaziza de l'atelier mécanique, pour leur gentillesse, leur bonne humeur et le temps qu'ils m'ont consacré à usiner mes pièces.

Je remercie Gilles Thollet, Annie Malchère et Thierry Douillard pour leur aide indispensable en microscopie.

Je remercie également Concetta Contet et Antonia Riccobene pour leur gentillesse, leur soutien dans les moments difficiles et leur aide dans les démarches administratives. Mais également Liliane Quillot, pour sa gentillesse et sa bonne humeur mais surtout pour les fameux « conseils de Mme Quillot ».

Tous mes remerciements à tous mes amis du laboratoire qui ont fait de ma thèse des moments de joie et de bonne humeur. Des remerciements particuliers à Sandrine ma collègue des deux premières années de thèse, pour son amitié, sa joie de vivre, sa bonne humeur et qui a su être là pour moi dans tous les moments difficiles... mais aussi pour m'avoir coaché en course à pied !! Un grand merci à mes co-bureaux Ludo, 1<sup>er</sup> co-bureau, pour ses histoires extrapôlées, puis Romain pour m'avoir supporté pendant la rédaction mais également pour tous les bons moments passés ensemble et pour la passion que tu m'as fait découvrir en guitare ! enfin à Senorita Marlin pour sa bonne humeur et son soutien important en fin de thèse.

Mais aussi à Katia, Martin, Nico, Aurélien « Timomille », Philippe, Lucile, Inès, Ali, Mira, Mirella, Komkrisd, Pape, Arnaud, Wafa et les tous les autres thésards.

Enfin à Xavier Kleber pour sa gentillesse et son soutien et à Stéphanie Deschanel pour sa gentillesse, sa joie de vivre et pour tous les bons moments passer à la peinture et toutes les autres personnes du laboratoire MATEIS.

Enfin je remercie toutes les personnes que j'ai pu oublier.

## Résumé

---

Ce mémoire porte sur la caractérisation d'un matériau composite polyacide lactique-bioverre pour application comme dispositif de réparation osseuse. Le bioverre étant trop fragile pour être utilisé seul comme dispositif de réparation osseuse, celui-ci est associé à une matrice polymère résorbable permettant d'apporter le caractère bioactif à des matériaux pouvant être mis en forme par des procédés de plasturgie.

Le matériau composite polyacide lactique-bioverre est ainsi mis en forme par injection à partir de granules composites élaborées par voie solvant. La caractérisation des propriétés de ce matériau composite a révélé une augmentation du module élastique avec l'ajout de charges, mais une diminution de la contrainte et de la déformation à la rupture. Les modifications des propriétés mécaniques ont été associées à une modification des propriétés de la matrice et notamment de sa masse moléculaire. Une meilleure maîtrise de la masse moléculaire du composite serait un moyen de contrôler sa cinétique de dégradation *in vivo* et ainsi d'adapter ses propriétés en fonction du cahier des charges des applications visées.

Dans une seconde partie, l'effet du taux de bioverre sur le caractère bioactif du composite a été évalué par immersion dans un fluide biologique de plusieurs polyacides lactiques chargés à 20, 30 et 50% (en masse). Un scénario de cristallisation à la surface des différents composites a ainsi été proposé.

Enfin ce matériau étant destiné à être implanté, une étude de biocompatibilité *in vitro* a été menée par culture de cellules ostéoblastiques à la surface des matériaux. Enfin la biocompatibilité du composite *in vivo*, son caractère biorésorbable et ostéoconducteur ont été évalués par implantation du matériau composite dans les tissus musculaires et osseux de lapins.

**Mots-Clés:** composite – polymère biorésorbable – bioverre – bioactivité – biocompatibilité



# TABLE DES MATIERES

<b><u>Index des termes utilisés</u></b>	<b>9</b>
<b><u>Introduction générale</u></b>	<b>11</b>
<b>A. ETAT DE L'ART</b>	
<b>A.I. Les dispositifs médicaux d'aide à la réparation osseuse</b>	<b>15</b>
A.I.1 Les dispositifs médicaux	15
A.I.2 Utilisation clinique des dispositifs de réparation osseuse	17
<b>A.II. Les matériaux actuellement utilisés pour nos applications</b>	<b>28</b>
A.II.1 Les métaux et alliages métalliques	28
A.II.2 Les polymères biorésorbables	31
<b>A.III. Les matériaux composites organiques-inorganiques</b>	<b>40</b>
A.III.1 Les différentes voies de synthèse des composites organiques-inorganiques résorbables	42
A.III.2 Caractérisation des propriétés mécaniques	44
A.III.3 Caractérisation de la bioactivité et de la dégradation in vitro des composites	50
A.III.4 Biocompatibilité in vitro et in vivo	56
<b>A.IV. Conclusion</b>	<b>60</b>
<b>B. CHAPTER B</b>	
<b>B.I. Introduction</b>	<b>71</b>
<b>B.II. Materials and methods</b>	<b>72</b>
B.II.1 Materials	72
B.II.2 Two different routes for polymer and composite processing	73
B.II.3 Microstructural and morphological characterization	75
B.II.4 Mechanical characterization	77
<b>B.III. Results</b>	<b>78</b>
B.III.1 Properties of polymer and composite elaborated by injection moulding	78
B.III.2 Improvement of the composite properties with the second elaboration route	84
B.III.3 Microstructure of both injected and pressed materials	85
<b>B.IV. Conclusion</b>	<b>91</b>
<b>C. CHAPTER C</b>	
<b>C.I. Introduction</b>	<b>98</b>
<b>C.II. Materials and methods</b>	<b>99</b>
C.II.1 Materials	99
C.II.2 Bioactivity testing	100
C.II.3 X-ray diffraction and Rietveld analysis	100
C.II.4 Microscopic observation	101
C.II.5 Polymer weight loss	101



<b>C.III. Results</b>	<b>101</b>
C.III.1 Visual inspection and SEM observation	101
C.III.2 Follow up of crystallization by XRD analysis	104
<b>C.IV. Discussion</b>	<b>110</b>
<b>C.V. Conclusion</b>	<b>112</b>
<b>D. CHAPTER D</b>	
<b>D.I. Introduction</b>	<b>119</b>
<b>D.II. Materials and methods</b>	<b>120</b>
D.II.1 Polymer and composite materials	120
D.II.2 In vitro degradation	120
D.II.3 Cytocompatibility	123
D.II.4 Biocompatibility in vivo	123
<b>D.III. Results</b>	<b>128</b>
D.III.1 Degradation in vitro	128
D.III.2 Cytocompatibility in vitro	133
D.III.3 Biocompatibility in vivo	134
<b>D.IV. Discussion</b>	<b>140</b>
D.IV.1 Impact of sterilization on the polymer matrix molecular weight	140
D.IV.2 Acceleration of polymer matrix degradation in vitro with addition of Bioglass® particles	141
D.IV.3 Cytocompatibility in vitro of the P(L,DL)LA/Bioglass® composite	142
D.IV.4 In vivo biocompatibility of the composite and acceleration of bone growth	143
D.IV.5 Comparison between in vitro and in vivo degradation	144
<b>D.V. Conclusion</b>	<b>144</b>
<b><u>Appendix to the chapter D</u></b>	<b>149</b>
<b><u>Conclusion générale</u></b>	<b>153</b>

## INDEX DES TERMES UTILISES

Les termes matérialisés par une étoile \* dans le texte sont définis ci-dessous.

**Bioactif** : un matériau bioactif est un matériau qui induit une réponse biologique spécifique à l'interface avec le matériau, réponse qui a pour conséquence la formation d'un lien entre les tissus et le matériau (Williams D.F., 1986)<sup>1</sup>.

**Biocompatibilité** : un matériau biocompatible est un matériau qui n'induit pas de réponse inflammatoire aiguë ou chronique. Définition élargie : capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique.

**Bio-fonctionnalité** : est définie comme la capacité d'un matériau à effectuer une application spécifique avec une réponse appropriée de l'hôte (Williams D.F., 1986)<sup>1</sup>.

**Chirurgie orthognathique** : chirurgie des anomalies du squelette de la face (dysmorphoses faciales).

**Chirurgie plastique** : selon la définition du syndicat national de la chirurgie plastique reconstructrice et esthétique : «Appellation globale de notre spécialité, elle englobe la totalité des interventions qui modifient, réparent ou embellissent les téguments et les formes. On distingue : la chirurgie réparatrice qui apporte une transformation allant de "l'anormal ou pathologique" vers le "normal" ; la chirurgie esthétique qui fait passer du "normal" vers le "beau" hors contexte de maladie (...). »

**Dispositif médical implantable actif** : tout dispositif médical actif qui est conçu pour être implanté en totalité ou en partie, par une intervention chirurgicale ou médicale, dans le corps humain ou, par une intervention médicale, dans un orifice naturel et qui est destiné à rester après l'intervention.

**Foyer ouvert** : quand le chirurgien ouvre le foyer de fracture pour réduire et/ou stabiliser la fracture.

**Glycosaminoglycanes (GAG)** : ce sont des chaînes linéaires sulfatées composées de la répétition d'un diholoside de base contenant toujours une hexosamine et un autre ose. Ils forment d'importants composants des tissus conjonctifs et représentent environ 30% de la matière organique.

**Hernie discale** : le vieillissement discal débute souvent, après une phase de déshydratation, par des fissures, déchirures de l'anneau fibreux. Le noyau peut alors, le long de ces fissures, migrer dans l'épaisseur de l'anneau et entraîner des douleurs lombaires aiguës ou chroniques. S'il se déplace encore plus au travers de l'anneau, le noyau peut saillir à la face postérieure du disque en formant alors une hernie discale.

**Instabilité** : mouvement anormal ou excessif entre deux ou plusieurs vertèbres.

**Loi de Wolff** : Principe reliant la structure et l'architecture internes de l'os aux contraintes mécaniques externes. Le remodelage osseux se produit en réponse aux contraintes mécaniques de telle façon que la nouvelle structure osseuse soit adaptée aux contraintes appliquées.

**Os zygomatique** ou **zygoma** (anciennement os malaire) : os qui possède un corps correspondant au relief palpable de la pommette.

**Ostéochondrite** : Trouble de la croissance de l'os et du cartilage de certaines régions telles que l'épiphyse (extrémité d'un os), les corps vertébraux, l'apophyse (partie saillante d'un os), les petits os et certaines autres articulations.

**Ostéoconduction** : ce terme signifie que l'os croît à la surface. Une surface ostéoconductive est donc une surface qui permet la croissance osseuse à sa surface ou à l'intérieur de ses pores<sup>2</sup>.

**Ostéoinduction** : ce terme signifie que des cellules primaires, indifférenciées et pluripotentes sont d'une façon ou d'une autre stimulées pour se différencier en cellules osseuses<sup>2</sup>.

**Ostéointégration** : contact direct entre le tissu vivant et l'implant. Une définition histologique serait l'ancrage d'un implant par la formation d'un tissu osseux autour de l'implant sans la croissance d'un tissu fibreux à l'interface os-implant.

**Ostéosynthèse** : réduction chirurgicale des fractures par la réunion des fragments osseux et son maintien à l'aide de vis, fils, plaques, clous ou autres moyens mécaniques.

**Ostéotomie tibiale** : Intervention au cours de laquelle le chirurgien va modifier l'axe du tibia, afin que les pressions du poids du corps évitent la zone pathologique et se reportent sur une zone de l'articulation où le cartilage est encore sain. Cette intervention est généralement indiquée dans les génu-varum.

**Tissu ostéoïde** : tissu de soutien de l'os, synthétisé par les ostéoblastes et les ostéocytes. Il est constitué de collagène de type I, inclus dans un gel de glycosaminoglycanes contenant des glycoprotéines spécifiques (comme l'ostéocalcine), qui lient fortement le calcium.

**Vis de traction** : vis qui glisse dans le fragment osseux situé près de sa tête et qui a une parfaite prise dans le fragment opposé. Elle fonctionne donc comme un davier définitif en comprimant les fragments osseux l'un contre l'autre

1. Williams DF. *Definitions in Biomaterials : Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. Vol. 4. Chester; 1986.
2. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* 2001, 10:S96-S101.

## Introduction générale

Selon la définition élaborée à Chester en 1991 par la Conférence de Consensus<sup>1</sup>, les biomatériaux sont des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qui participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle.

Le marché mondial des biomatériaux est très important et en pleine croissance. La commission européenne a évalué récemment ce marché mondial à 25 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 5 à 7%. L'Europe représente environ un tiers de ce marché mondial. La part orthopédique des biomatériaux est évaluée au niveau mondial à 8 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 7%. Ce marché concerne pour 40% les prothèses de hanche et de genou avec au niveau mondial respectivement 750 000 et 500 000 opérations par an.

Les biomatériaux utilisés pour implantologie ou comblement osseux suscitent un intérêt croissant. Ils représentent une alternative aux autogreffes (prélèvements de tissu sur l'individu), aux allogreffes (prélèvement de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort) et aux xélogreffes (prélèvements de tissu sur une espèce différente).

Pendant longtemps les matériaux recherchés devaient être des matériaux les plus inertes possibles vis-à-vis des tissus vivants. Aujourd'hui une interaction positive entre le matériau et les tissus vivants est clairement visée, dans le but d'une intégration voire d'un remplacement par les tissus naturels. Ces stratégies reposent en général sur l'aptitude d'un tissu naturel à s'autoréparer. L'os a une grande capacité à se régénérer, et à s'adapter à l'environnement mécanique appliqué. Quand la quantité de tissu osseux endommagé est relativement faible, les tissus endommagés peuvent se réparer spontanément grâce à leur capacité d'auto-reconstruction et à l'apport de nutriments. Mais quand la perte osseuse est trop importante, celle-ci peut conduire à une perte de fonction du tissu endommagé. La recherche s'oriente donc actuellement vers des matériaux dits « bioactifs », c'est-à-dire qui présentent une affinité avec les tissus environnants.

Dans le cas des dispositifs de fixation osseuse, le cahier des charges est double : favoriser la repousse osseuse et assurer temporairement un rôle de consolidation mécanique du tissu osseux. Les recherches actuelles s'orientent vers des matériaux composites organiques-inorganiques, qui se rapprochent de la composition naturelle du tissu osseux. En effet, le tissu osseux est un matériau composite composé de fibres de collagène et de nanoparticules d'hydroxyapatite précipitées le long de fibrilles de collagène qui contribuent notamment à la rigidité de l'os.

Ce travail s'intègre dans le cadre d'une thèse Cifre réalisée entre les laboratoires MATEIS et RTI2B et la société Noraker (Villeurbanne), spécialisée dans la conception et le développement de dispositifs médicaux implantables à base de biomatériaux synthétiques et résorbables. Mon sujet de thèse porte sur la caractérisation d'un matériau composite à matrice polyacide lactique chargée en bioverre pour application dans la réparation osseuse. Cette thèse est divisée en quatre parties. Tout d'abord, un état de l'art de la littérature existante sur les matériaux composites organiques-inorganiques pour application dans le comblement osseux sera présenté. Cette thèse sera ensuite organisée sous forme d'articles

rédigés en anglais, chacun étant précédé d'un court résumé en français. Les chapitres B, C et D sont des articles présentant les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse.

Le premier objectif de cette thèse est de caractériser le matériau composite polyacide lactique – bioverre 45S5 mis en forme par injection. Le chapitre B traite donc de la caractérisation microstructurale, physique et mécanique du matériau composite polyacide lactique – bioverre 45S5 mise en forme par injection. Une première étape va consister à contrôler la dispersion des charges dans la matrice. Puis les propriétés mécaniques et morphologiques des matériaux seront étudiées. Cette étude est réalisée sur un composite chargé à 30% en masse de bioverre®.

Le chapitre C compare la bioactivité de plusieurs composites chargés à 20, 30 et 50% en masse en bioverre, par immersion dans un fluide biologique. Cette étude vise à déterminer l'effet du taux de bioverre sur la cinétique de formation de l'hydroxyapatite à la surface du composite. Elle est menée en parallèle sur du bioverre seul, pour déterminer l'effet de la matrice polymère sur la capacité bioactive du bioverre. Enfin l'objectif de cette étude est également de suivre en détail les procédés de cristallisation ayant lieu à la surface des composites, en fonction du taux de bioverre.

Le matériau étant destiné à être implanté, la caractérisation de sa biocompatibilité *in vivo* est une étape indispensable dans le développement de ce matériau. Cependant avant cette étude *in vivo*, une étape préliminaire de simulation du comportement *in vitro* est indispensable. Ce dernier chapitre (chapitre D) s'attèle donc à la présentation du comportement du composite *in vitro* après immersion dans un fluide biologique. Puis la cytocompatibilité *in vitro* a été confirmée par culture de cellules sur le matériau. Enfin la dernière étape dans la caractérisation biologique de ce matériau est son implantation chez l'animal, pour mieux appréhender sa cinétique de dégradation et sa capacité à régénérer de l'os à sa surface. Cette étude est réalisée sur un composite chargé à 30% en masse.

Une conclusion générale sera portée sur l'ensemble de ce travail, pour résumer les résultats obtenus et proposer des perspectives possibles pour ce travail.

1. The European Society for Biomaterials 9th European Conference on Biomaterials Chester, UK 9–11th September, 1991 in conjunction with 2nd Consensus Conference on Definitions in Biomaterials 7–8th September, 1991 and IUPAC working party on blood compatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1991, 2:62-62.

# CHAPITRE A

## A. ETAT DE L'ART

<b>A.I. Les dispositifs médicaux d'aide à la réparation osseuse</b>	<b>15</b>
A.I.1 Les dispositifs médicaux	15
A.I.2 Utilisation clinique des dispositifs de réparation osseuse	17
<b>A.II. Les matériaux actuellement utilisés pour nos applications</b>	<b>28</b>
A.II.1 Les métaux et alliages métalliques	28
A.II.2 Les polymères biorésorbables	31
<b>A.III. Les matériaux composites organiques-inorganiques</b>	<b>40</b>
A.III.1 Les différentes voies de synthèse des composites organiques-inorganiques résorbables	42
A.III.2 Caractérisation des propriétés mécaniques	44
A.III.3 Caractérisation de la bioactivité et de la dégradation in vitro des composites	50
A.III.4 Biocompatibilité in vitro et in vivo	56
<b>A.IV. CONCLUSION</b>	<b>60</b>

Cette thèse porte sur le développement et la caractérisation de matériaux composites denses organiques-inorganiques dédiés à la réparation osseuse. Ces matériaux auront pour vocation de favoriser la repousse osseuse tout en jouant un rôle temporaire de consolidation mécanique du tissu osseux. En d'autres termes, en plus d'être 'bioactifs\*', ces matériaux remplaceront temporairement la fonction mécanique de l'os. Ils se distinguent ainsi des composites organiques-inorganiques poreux utilisés uniquement dans un rôle de comblement osseux. Les matériaux actuellement utilisés dans la réparation osseuse sont souvent des matériaux métalliques ou quand les applications ne nécessitent pas une grande résistance mécanique des polymères résorbables. Les recherches s'orientent actuellement vers des matériaux composites polymère biorésorbable / biocéramique, cette thèse s'intègre dans ce contexte et vise à caractériser un matériau composite polyacide lactique / bioverre.

Les domaines d'application visés par ces matériaux sont assez vastes et touchent la chirurgie orthopédique (notamment la chirurgie rachidienne et la chirurgie de reconstruction ligamentaire) et la chirurgie maxillo-faciale. Une description des dispositifs médicaux utilisés dans chacun de ces domaines sera présentée dans une première partie. Seuls les dispositifs médicaux susceptibles d'être remplacés par des matériaux composites seront présentés. Nous n'entrerons pas en détail dans ce manuscrit sur la description de la composition et de la structure du tissu osseux, qui ont déjà été détaillées dans de précédents manuscrits réalisés au laboratoire<sup>1,2</sup>.

Les matériaux les plus couramment utilisés pour les systèmes de consolidation osseuse, restent actuellement les métaux et alliages métalliques, en raison de leurs excellentes propriétés mécaniques. Historiquement les matériaux recherchés devaient être les plus inertes possibles vis-à-vis des tissus environnants. Mais leur caractère « étranger » engendre souvent le développement d'une capsule fibreuse autour de l'implant. Ces matériaux interfèrent avec les systèmes d'imagerie médicale, rendant difficile le suivi opératoire du patient. Enfin, ces implants non résorbables peuvent nécessiter une seconde opération pour être retirés. En effet, dans le cas des systèmes d'ostéosynthèse\*, une fois l'os consolidé, le dispositif est généralement retiré. Toutes ces difficultés ont conduit, depuis la fin des années 1960, au développement de polymères biorésorbables. Ces matériaux sont actuellement utilisés dans les dispositifs de fixation osseuse, mais leur utilisation clinique reste très restreinte par rapport aux implants métalliques, qui ont un recul clinique plus important. La deuxième partie de cette étude bibliographique s'attache ainsi à décrire les différents matériaux utilisés actuellement dans les systèmes de consolidation osseuse. Cette description montre les limites de chacun des types de matériaux et met en évidence l'intérêt du développement de matériaux composites pour ce type d'applications.

Ces matériaux étant destinés à être implantés dans le tissu osseux, une fonction d'ostéoconduction\*, voire d'ostéoinduction\*, est vivement recherchée. Les matériaux composites organiques-inorganiques se présentent donc comme une alternative intéressante aux matériaux actuellement sur le marché. La dernière partie de cette étude bibliographique présente le panorama des différents matériaux composites organiques-inorganiques en cours de développement. Les différentes voies d'élaboration de ces matériaux seront discutées. Le mode d'élaboration et le taux de phase minérale sont des paramètres déterminants sur les propriétés mécaniques et biologiques du composite.

## **A.I. Les dispositifs médicaux d'aide à la réparation osseuse**

Le panorama des dispositifs de réparation osseuse étant très vaste, nous nous intéresserons uniquement aux applications potentielles du matériau composite développé dans ce mémoire. Après avoir défini la notion de dispositif médical et dressé un aperçu du marché des dispositifs médicaux, nous verrons plus en détail les différents dispositifs utilisés actuellement en clinique.

---

### **A.I.1 Les dispositifs médicaux**

#### a) Le dispositif médical selon le code de la santé publique

---

Le dispositif médical est défini dans le code de la santé publique comme « tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens» (articles L 5211-1 et R 5211-1)<sup>3</sup>.

#### b) La classification des dispositifs médicaux

---

Outre les dispositifs médicaux implantables actifs\*, il existe une classification des dispositifs médicaux en quatre catégories (I, IIa, IIb, III) correspondant à des niveaux de risque croissants. Selon l'annexe IX de la directive 93/42/CEE<sup>3</sup>, les matériaux composites organiques-inorganiques ici développés font partie de la classe III des dispositifs médicaux. Car en plus d'être destinés à un usage à long terme, ils présentent un effet biologique et un caractère biorésorbable. Ces matériaux sont considérés selon la directive comme ayant un risque potentiel critique. Les exigences réglementaires pour ces dispositifs sont donc assez élevées.

La directive fixe des exigences essentielles en matière de sécurité et de performances revendiquées par le fabricant. La preuve de la conformité à ces exigences essentielles est amenée par la référence à des normes européennes harmonisées ou par toute solution technique équivalente. Pour les dispositifs de classe III, la directive 2007/47/CE qui complète la 93/42/CEE impose la réalisation d'investigations cliniques ou sinon la justification que le recours aux données cliniques existantes ou à la littérature scientifique suffit.

Pour tous les dispositifs médicaux, la soumission d'un dossier technique est obligatoire. L'annexe VII de la directive 93/42/CEE précise le contenu de la documentation technique qui doit comprendre entre autres:

- une description générale du dispositif médical ;



- un dossier de conception ;
- les résultats de l'analyse des risques menée tout au long du cycle de vie du dispositif médical ;
- la liste des normes appliquées et une description des solutions adoptées pour satisfaire aux exigences essentielles de la directive, le cas échéant ;
- une description des méthodes de stérilisation ;
- une évaluation clinique selon l'annexe X ;
- l'étiquetage et les instructions d'utilisation...etc.

### c) Le marché des dispositifs médicaux

Le marché des dispositifs médicaux connaît une forte croissance en raison notamment du vieillissement de la population, de l'élévation du niveau de vie et de l'augmentation de la fréquence de l'obésité. En 2008, l'industrie mondiale des dispositifs médicaux était estimée à 116,7 milliards d'euros<sup>4</sup>. En France, le marché a été évalué à 6,2 milliards d'euros, dont 9% sont représentés par l'orthopédie (Figure 1). La part de chaque spécialité dans le marché de l'orthopédie est présentée dans la Figure 2.

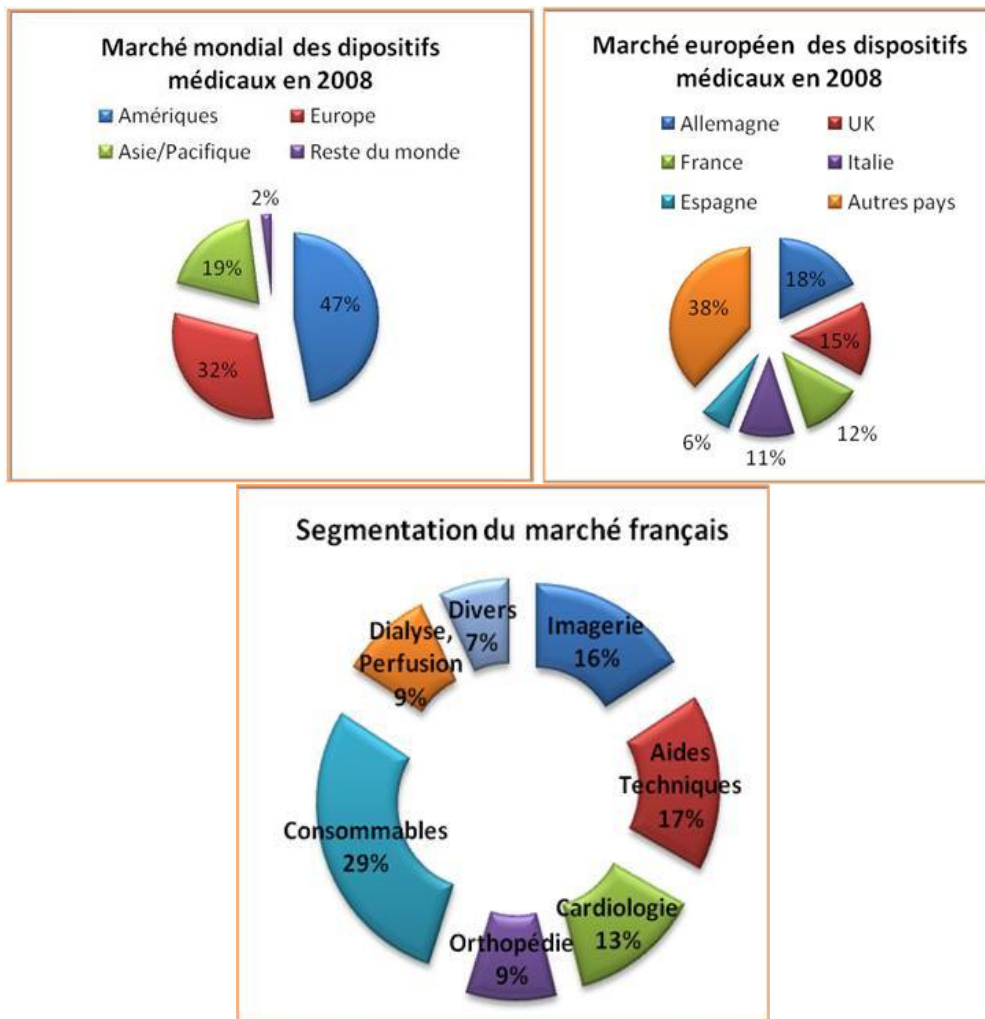


Figure 1. Données Snitem du marché mondial, européen et français des dispositifs médicaux<sup>4</sup>.

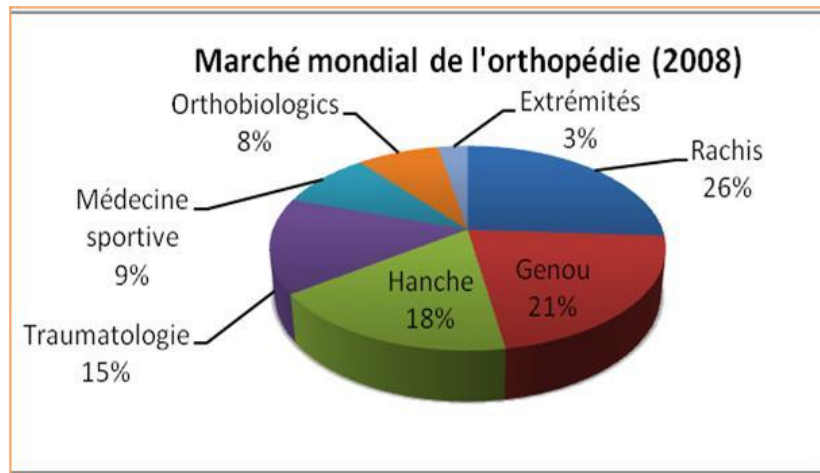


Figure 2. Segmentation du marché mondial de l'orthopédie en fonction des spécialités<sup>4</sup>.

### A.I.2 Utilisation clinique des dispositifs de réparation osseuse

Les applications cliniques du composite développé au cours de ce travail peuvent concerner de nombreux domaines comme la chirurgie orthopédique (notamment les chirurgies du rachis et de la reconstruction ligamentaire) et la chirurgie maxillo-faciale (Fig. 3).

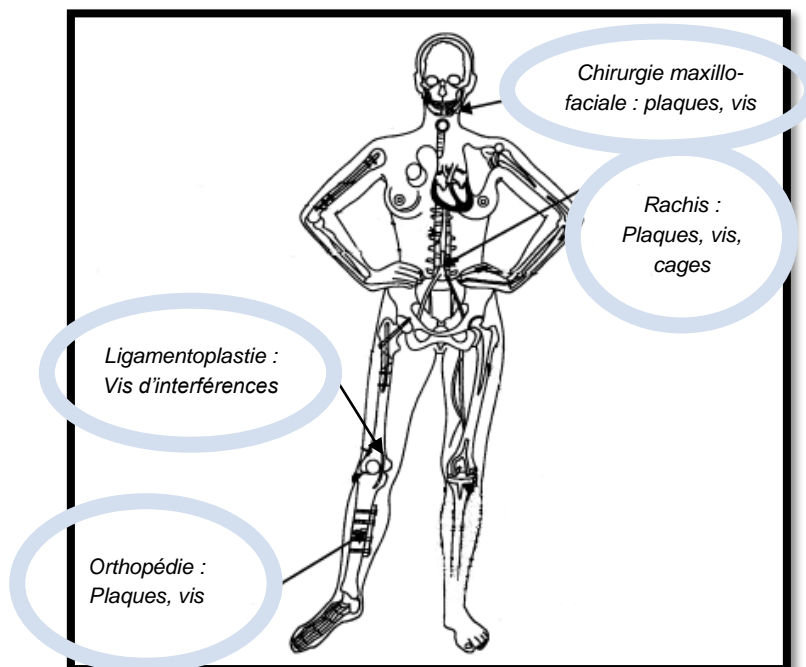


Figure 3. Les différents domaines d'application potentiels du composite développé.

Les parties suivantes traitant des dispositifs médicaux utilisés dans la réparation osseuse, un bref rappel de la composition et des propriétés de l'os est présenté en première partie.

a) Composition et propriétés de l'os

---

La composition de l'os

Le tissu osseux est un tissu composite, formé de plusieurs phases distinctes : une phase minérale formée essentiellement de phosphate de calcium apatitique ; une phase organique constituée essentiellement de collagène mais aussi de protéoglycanes et de protéines non collagéniques. La partie minérale de l'os est majoritairement responsable de sa rigidité et de sa résistance mécanique et la partie organique lui apporte sa ductilité et de sa ténacité.

La structure multi échelle de l'os

Le tissu osseux présente une structure hiérarchique de l'échelle du nm à celle du cm. Cette structure hiérarchique explique l'exceptionnelle combinaison de propriétés de l'os, qui associe une bonne résistance à une grande ténacité. La plupart des os sont le résultat d'une construction élaborée, formés d'un noyau cellulaire poreux (l'os trabéculaire ou spongieux) entouré d'une partie dense (l'os compacte) (cf. Fig. 4). L'os cortical représente 80% de notre masse osseuse contre 20% pour l'os spongieux.

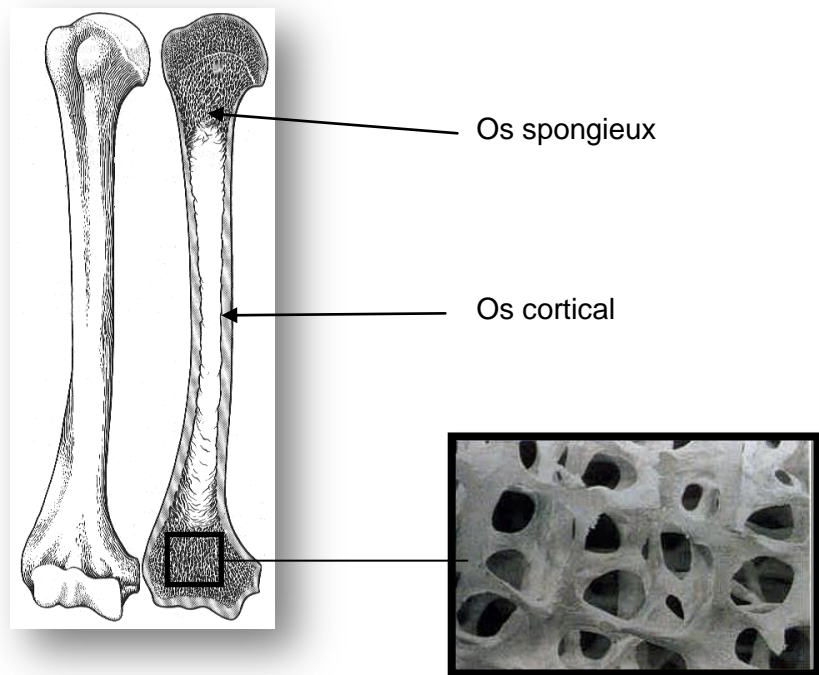


Figure 4 : Coupe transversale d'un fémur<sup>5</sup> et zoom sur une partie de l'os spongieux montrant des cellules ouvertes.

La structure de l'os spongieux

L'os spongieux dérive de l'arrangement des lamelles en trabécules. Dans ce cas les lamelles sont plates et forment une structure tubulaire. L'os spongieux est alors constitué d'un réseau interconnecté de tiges ou de plaquettes. Aux plus faibles densités, les cellules sont ouvertes et comme un réseau de tiges (cf. Fig. 4). Au fur et à mesure que la densité augmente, les tiges s'étendent et s'aplatissent, ressemblant plus à des plaques, et

finalement fusionnent pour donner presque des cellules fermées<sup>6</sup>. La densité relative de l'os spongieux varie de 0.05 à 0.7 g/cm<sup>3</sup>.

La structure de l'os cortical

Dans l'os, la phase inorganique d'hydroxyapatite (cristaux de quelques nanomètres) est fortement liée aux molécules de collagène. Ces dernières s'assemblent pour former des fibrilles de collagène, alignées dans des lamelles osseuses. Cela entraîne une grande anisotropie des propriétés mécaniques des lamelles. Celles-ci forment ensuite les ostéons, structures tubulaires à parois épaisses dans lesquelles les murs sont constitués de plusieurs couches de lamelles, orientées selon l'axe de l'ostéon. La partie caverneuse centrale de cette structure s'appelle le canal de Havers.

Comportement mécanique de l'os

Le tissu osseux présente un comportement mécanique complexe anisotrope, ses propriétés mécaniques étant plus importantes longitudinalement que transversalement (Tableau 1). C'est également un tissu très résistant, capable de supporter d'importantes contraintes mécaniques. Les propriétés mécaniques de l'os cortical et de l'os spongieux sont très différentes, notamment suite aux fortes différences de porosités. L'os trabéculaire est de 10 à 1000 fois moins rigide en compression que l'os cortical, mais supporte de plus grande déformations et par conséquent les zones trabéculaires jouent un rôle d'amortisseur alors que l'os cortical assure la rigidité en flexion des os longs<sup>7</sup>. Le comportement mécanique de l'os spongieux est typique d'un matériau cellulaire. La courbe contrainte-déformation en compression comporte les trois régimes distincts caractéristiques de tous les solides cellulaires :

- une partie linéaire correspondant au domaine élastique ;
- une phase de déformation irréversible à contrainte constante donnant lieu à un plateau sur la courbe de compression ;
- une phase de consolidation, après l'affaissement complet des cellules de la structure spongieuse.

Comme décrit dans le paragraphe sur la structure de l'os, le caractère anisotrope de l'os cortical est lié à l'alignement des ostéons le long de l'axe longitudinal dans les os longs. Le comportement mécanique de l'os cortical est également caractérisé par une résistance plus élevée en compression qu'en traction<sup>8</sup>. Il présente un comportement relativement ductile lors d'une sollicitation longitudinale, mais souvent fragile lors de sollicitations transverses. Il affiche un comportement viscoélastique, avec une sensibilité à la vitesse de chargement.

	<b>E (GPa)</b>	<b>σ<sub>c</sub> (MPa)</b>	<b>σ<sub>t</sub> (MPa)</b>	<b>ε<sub>R</sub> (%)</b>
Os cortical (direction longitudinale)	17 – 25	130-220	80 – 150	1-3
Os cortical (direction transversale)	6-13	100-130	50-60	
Os spongieux (direction longitudinale)	0.26 – 0.9	3.6 – 9.3	20	5-7
Os spongieux (direction transversale)	0.01 – 0.4	0.6 – 4.9	2	

Tableau 1 : Propriétés mécaniques de l'os : E : module d'Young ; σ<sub>c</sub> : résistance en compression ; σ<sub>t</sub> : résistance en traction ; ε<sub>R</sub> : déformation à la rupture<sup>6, 9-12</sup>.

## b) Les dispositifs de réparation osseuse en chirurgie orthopédique

---

### - Les dispositifs d'ostéosynthèse pour les fractures

Nous rappellerons que la chirurgie orthopédique est la chirurgie relative au traitement des lésions de l'appareil locomoteur, elle inclut également la traumatologie. En chirurgie orthopédique et traumatologique, les systèmes de réparation des fractures sont appelés couramment systèmes d'ostéosynthèse. L'ostéosynthèse peut être définie comme la réduction chirurgicale des fractures par la réunion des fragments osseux et son maintien à l'aide de vis, fils, plaques, clous, ou autres moyens mécaniques. On peut distinguer différents types de fractures en fonction de leur siège et de leur orientation. Pour faire face à la grande diversité des fractures et s'adapter à toutes les circonstances, un éventail de moyens d'ostéosynthèse est proposé par les laboratoires aux chirurgiens pour stabiliser la fracture et permettre la consolidation osseuse dans les plus brefs délais. Les fractures peuvent être traitées orthopédiquement ou chirurgicalement. Le traitement orthopédique ne nécessite pas d'ouverture du foyer de fracture et utilise des systèmes de contentions externes (bandages compressifs, orthèses, plâtres). Le traitement chirurgical peut se faire à foyer ouvert\* ou à foyer fermé. Nous détaillerons ici uniquement les systèmes d'ostéosynthèse internes, qui sont une des applications visées par le matériau composite.

#### - Les vis

Les vis sont utilisées pour fixer directement les fragments osseux entre eux ou pour fixer des plaques sur l'os. Dans le premier cas, on peut parler de vis de traction assurant une compression entre deux fragments osseux. Une vis comprend une tête, un corps et une pointe. Le corps se caractérise par le filetage qui s'étend sur toute la hauteur ou seulement sur la partie terminale (Figure 5). Les vis sont ainsi caractérisées par leur type et par le diamètre extérieur du filetage principal. Parmi les différents types de vis, on peut citer entre autres les vis dites corticales, les vis dites spongieuses et les vis verrouillables.

Les vis corticales ont un pas conçu pour obtenir une bonne prise dans l'os cortical. Elles sont normalement utilisées pour comprimer et fixer une plaque à l'os.

Les vis spongieuses ont un rapport diamètre extérieur sur diamètre intérieur supérieur à celui des vis corticales afin d'avoir une meilleure tenue dans l'os spongieux. Elles sont surtout utilisées comme vis de traction pour obtenir une compression interfragmentaire.

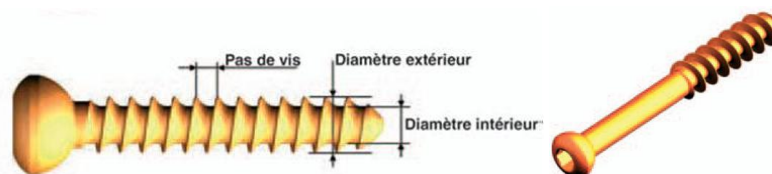


Figure 5. Vis corticale (à gauche) et vis spongieuse (à droite)<sup>13</sup>.

Les vis verrouillables sont uniquement utilisées avec une plaque. La tête filetée permet de verrouiller la vis dans une plaque prévue à cet effet (Figure 6). Verrouillées, la vis et la plaque forment alors un implant unique et stable à angle fixe. Les vis présentes sur le marché sont soit en acier inoxydable soit en titane.



Figure 6. Vis : (a) V30 d'ostéotomie métatarsienne, (b) V23 d'ostéotomie phalangienne, (c) V20 d'ostéotomie de type Weil, Biotech, France<sup>14</sup>.

- Les plaques

Une plaque est un système extramédullaire qui permet en combinaison avec des vis, de stabiliser une fracture jusqu'à la consolidation de celle-ci. Elles se caractérisent par leur longueur, leur épaisseur ainsi que le nombre, la forme et la disposition de trous. On distinguera deux types de plaques, les plaques standards qui sont utilisées avec des vis standards (non verrouillables) et les plaques verrouillées. L'avantage de ces dernières est que la stabilité ne dépend pas que de la qualité de l'os ni du contact os/plaque, mais également des propriétés de l'implant.

Les plaques sont en général en acier ou en titane, mais aucune plaque en polymère n'est actuellement proposée. Un exemple de plaque d'ostéosynthèse pour l'ostéotomie tibiale est présenté sur la figure suivante (Figure 7).



Figure 7. Plaque Elix Plate® en acier inoxydable, pour ostéotomie tibiale, Biotech, France<sup>15</sup>.

- **Les dispositifs de consolidation osseuse en chirurgie rachidienne**

Le rachis assure la stabilité de la tête et du tronc et détermine la posture. Cette fonction est principalement prise en charge par les corps vertébraux. Les corps vertébraux et les arcs neurax des vertèbres renferment la moelle épinière et assurent ainsi sa protection. Des disques intervertébraux sont intercalés entre les corps vertébraux, ils jouent le rôle d'amortisseurs de chocs (Fig. 8).

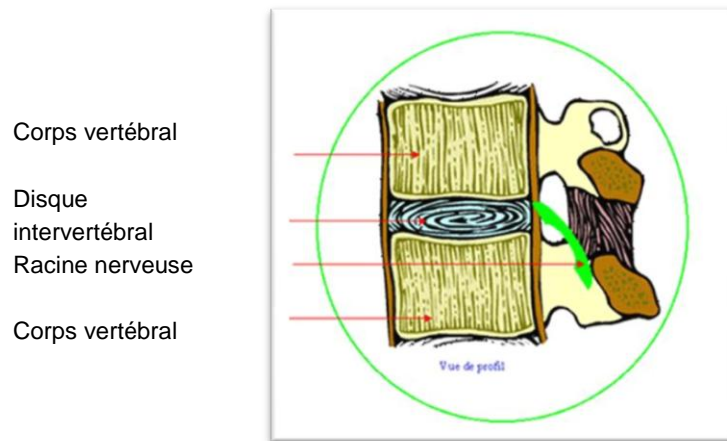


Figure 8. Schéma représentant la vue de profil d'un disque intervertébral<sup>16</sup>.

On peut distinguer plusieurs modes de fixation des vertèbres, utilisés en fonction de la pathologie ou du traumatisme. La fusion vertébrale est préconisée dans le cas de fractures ou malformations vertébrales, dans certaines hernies discales\* ou pour traiter des instabilités\*. Cette technique consiste à souder la vertèbre fracturée aux vertèbres sus et sous jacentes.

Elle peut se faire de différentes façons :

Par greffe osseuse : elle a été réalisée pour la première fois pour fusionner des vertèbres par Cloward en 1963. La greffe osseuse peut être prélevée sur le patient lui même (autogreffe), sur un autre sujet souvent décédé (allogreffe), voire sur un animal (xéno greffe). Pour des raisons de biocompatibilité, l'autogreffe est la technique la plus utilisée. Mais la quantité d'autogreffe disponible sur un individu est très limitée, et son prélèvement nécessite une intervention chirurgicale secondaire sur un site a priori sain, ce qui augmente les souffrances du patient. Le recours à l'allogreffe nécessite la disponibilité d'un donneur compatible et sain, et n'exclut pas le risque de transmission de maladies virales. Les xéno greffes quant à elles ne sont pas bien appréciées des chirurgiens car, en plus du manque de biocompatibilité avec les tissus humains, le risque de transmission de maladies de l'animal vers l'homme est très mal connu<sup>17</sup>.

Par fusion instrumentée : elle est réalisée à l'aide de vis, tiges et plaques (Figure 9), spécialement conçues pour maintenir ensemble les vertèbres lors de la fusion. Il existe plusieurs types d'instrumentations rachidiennes. Le principe est toujours le même, associant un implant d'ancrage vertébral se fixant sur un élément anatomique variable de la vertèbre (lame, pédicule, corps vertébral) et un système de liaison (plaque ou tige) unissant les implants d'ancrage entre eux.



Figure 9. Plaque **ATB (Anterior Tension Band)**, plaque antérieure de mise en tension pour la stabilisation de la colonne lombo-sacrée, en alliage de titane, Synthes, France<sup>18</sup>.

Par une cage intersomatique : elle est placée à la place du disque intervertébral pour fusionner les deux vertèbres concernées. La fusion peut être complétée par une instrumentation postérieure (vis, plaque). Certaines cages sont creuses afin d'être remplies par des greffes d'os pour favoriser la repousse osseuse. La greffe autologue par prélèvement d'os iliaque reste la solution la plus courante. Certaines cages sont pré remplies d'un insert en phosphate de calcium (Figure 10).

Les premières cages ont été produites en acier inoxydable puis en titane. L'utilisation de cage en titane telle que la cage de Harms<sup>19</sup> permet de bénéficier des propriétés biologiques de l'os autologue prélevé lors de la décompression et de répondre aux impératifs biomécaniques. Cependant le caractère radio-opaque de ces cages gêne l'évaluation de la fusion osseuse, la rigidité absolue expose au risque de stress-shielding, d'autre part la structure droite s'adapte mal à la courbure physiologique du rachis. Toutes ces limites ont conduit à l'utilisation de polymères. Le polyétheréthercétone (PEEK) est un des matériaux actuellement proposés, mais on trouve aussi de nouvelles cages en composite biorésorbable (Figure 10).



Figure 10. Cage **DUOSORB** en composite  $\beta$ -TCP/PLLA avec un insert en  $\beta$ -TCP, SBM, France<sup>20</sup>.

L'utilisation des cages dans le rachis lombaire a progressé depuis ces dernières années en raison du plus fort taux de succès obtenu par cette méthode comparé aux greffes osseuses ou aux techniques d'instrumentations utilisant des vis<sup>21</sup>. En revanche, l'utilisation des cages dans le rachis cervical n'a pas montré actuellement d'avantages significatifs par rapport aux fusions par greffe d'os.

Une autre alternative à la fusion des vertèbres est l'utilisation d'une prothèse de disque intervertébral. Contrairement aux interventions de fusion employées classiquement jusqu'ici, les prothèses de disque intervertébral permettent la conservation de la mobilité sur le



segment atteint et le non report de contraintes supplémentaires aux disques intervertébraux voisins qui pourraient étendre l'évolution dégénérative à d'autres segments. La fonction de cette prothèse est de rétablir (ou de préserver) la fonction dynamique normale, le mouvement, de la colonne vertébrale et d'apporter ainsi une nette réduction des douleurs.

- **Les dispositifs de consolidation osseuse dans la chirurgie des tissus mous**

Ancrage des tissus mous dans l'os

L'ancrage des tissus mous (tendons et ligaments) à l'os peut être assuré par une ancre de suture. Elle s'utilise dans différents sites comme l'épaule (Figure 11), le pied et la cheville, le genou, la main et le poignet, le coude et le pelvis. Elles sont disponibles en métal ou en polymère résorbable.

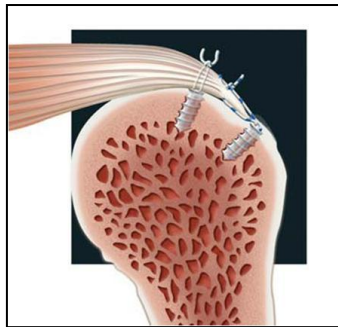


Figure 11. Schéma illustrant l'utilisation d'ancres de suture dans le traitement de la coiffe des rotateurs<sup>22</sup>.

Chirurgie de reconstruction ligamentaire

La ligamentoplastie est définie comme l'opération chirurgicale destinée à restaurer un ligament. Le principe de cette intervention est donc de restaurer la fonction ligamentaire en utilisant une autogreffe de tendons. Cette opération peut être appliquée pour le ligament croisé antérieur (LCA) du genou mais également sur d'autres ligaments comme ceux de la cheville. Nous allons illustrer ici l'exemple de la reconstruction du LCA de genou. Cette greffe est mise en place dans l'articulation par l'intermédiaire de petits tunnels osseux, au niveau du tibia et du fémur.

Dans le cas d'une rupture du ligament croisé, deux types de tendons peuvent être prélevés :

- Le tendon rotulien situé sous la rotule (Figure 12), il s'agit alors de la ligamentoplastie selon **Kenneth-Jones**.

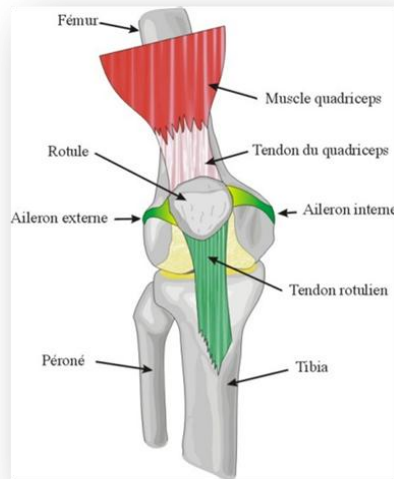


Figure 12 : Tendon rotulien<sup>23</sup>.

- le tendon de la "patte d'oie" situé sur le coté interne du genou. Il s'agit en fait de deux tendons, ceux des muscles **droit interne et demi tendineux** (Figure 13). Les tendons de ces deux muscles ainsi que celui du muscle couturier sont appelés « patte d'oie » car ils s'accrochent à l'intérieur du genou à la manière d'une patte d'oie. L'intervention porte alors le nom de ligamentoplastie par **DIDT (pour Droit Interne Demi Tendineux)**. Une fois prélevés, ces deux tendons sont pliés en deux, ce qui permet d'obtenir un nouveau ligament ayant 4 brins dont la résistance à la traction est alors supérieure à celle d'un ligament croisé antérieur normal (Figure 14).

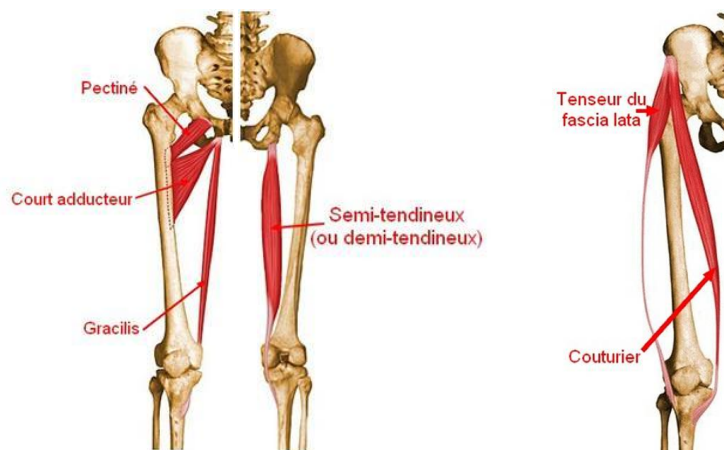


Figure 13. Muscle droit interne (ou Gracilis), muscle demi-tendineux et muscle couturier<sup>24</sup>.

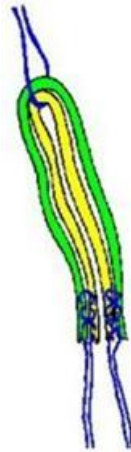


Figure 14 : Les deux tendons, droit interne et demi tendineux, pliés en deux pour obtenir un ligament à 4 brins<sup>23</sup>.

Deux tunnels sont alors creusés au niveau des insertions anatomiques tibiale et fémorale du ligament croisé antérieur, dans lesquels est glissé le greffon. La fixation de cette greffe se fait au niveau des tunnels par une vis d'interférence. Cette vis est introduite entre la paroi du tunnel et la greffe qu'elle vient ainsi bloquer (Figure 15).



Figure 15 : Radiographie post opératoire de face d'un genou opéré du LCA par des vis d'interférences<sup>25</sup>.

Les vis disponibles actuellement sur le marché peuvent être en métal, ou le plus souvent en polymère résorbable. Plus récemment des vis en composite polymère/biocéramique ont été commercialisées (Figure 16).



Figure 16. Vis d'interférence biorésorbable Biosteon™ en PLLA et HA, Stryker, France<sup>26</sup>.

c) Les dispositifs de consolidation osseuse en chirurgie maxillo-faciale

---

La chirurgie maxillo-faciale comprend la chirurgie plastique reconstructrice et esthétique\* de la face, celle des cancers de la bouche et de la face, celle des glandes salivaires et la chirurgie des os de la face. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la traumatologie maxillo-faciale qui est le domaine nécessitant des systèmes de fixation osseuse. Le traumatisme facial possède différents niveaux de gravité, allant du traumatisme le plus léger, au fracas facial associé à des lésions vitales engageant le pronostic vital. Cette traumatologie comprend les fractures du nez, de la mandibule, de l'os zygomatique\*, de l'os maxillaire, du sinus frontal, du plancher de l'orbite et les fractures complexes (Fig. 17).

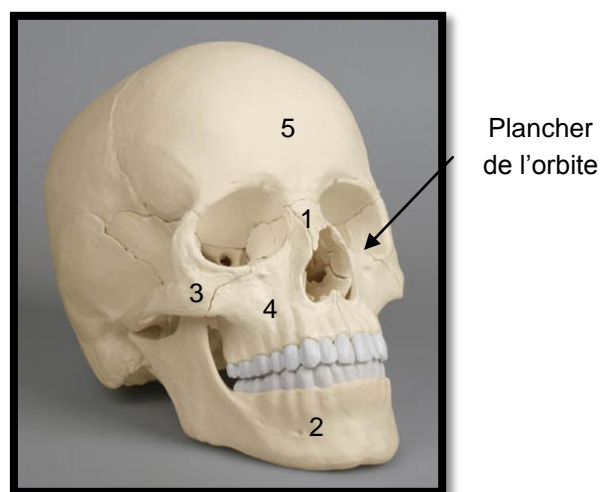


Figure 17 : Description anatomique des zones de fracture de la face : (1) l'os nasal ; (2) la mandibule ; (3) l'os zygomatique ; (4) l'os maxillaire ; (5) le sinus frontal.

La majorité des plaques et vis utilisées sont en titane, mais des implants en polymère résorbable sont également disponibles (Fig. 18).



Figure 18 : Plaques pour la chirurgie cranio-maxillo-faciale, poly L-Lactide/D-Lactide/Glycolide : 85/5/10, Stryker, France<sup>27</sup>.

### Exemple du cas d'un traumatisme touchant la mandibule

Toute chute sur le menton ou tout choc sur la mâchoire peut entraîner une fracture de la mandibule. La mandibule est aussi appelée mâchoire inférieure. Elle comprend deux parties, une partie dentée où se trouvent l'ensemble des dents et une partie non dentée qui comprend surtout le condyle. On peut avoir des fractures de la mandibule sur la portion dentée et sur la portion non dentées ou l'association des deux. Le traitement de ces fractures est variable, soit chirurgical en mettant une ostéosynthèse (plaque et vis) pour consolider la mâchoire, soit de la rééducation.

## **A.II. Les matériaux actuellement utilisés pour nos applications**

Le cahier des charges des matériaux destinés à la réparation osseuse est des plus stricts et doit considérer les aspects de bio-fonctionnalité\*, mais aussi et surtout les aspects de biocompatibilité\*. Ces matériaux sont caractérisés par leur multifonctionnalité, car en plus d'être biocompatibles, ils doivent être résistants aux sollicitations mécaniques et à la corrosion. Les implants visés ayant des formes complexes, ces matériaux doivent pouvoir être mis en forme par des techniques adaptées. Les métaux et alliages sont les matériaux généralement utilisés. Contrairement aux prothèses articulaires, les implants d'ostéosynthèse sont, en principe, destinés à être retirés secondairement. Ceci explique l'engouement depuis ces dernières décennies pour les polymères biodégradables. En effet ces matériaux se résorbent progressivement, évitant ainsi une seconde opération pour les retirer.

---

### **A.II.1 Les métaux et alliages métalliques**

Ce sont les matériaux les plus utilisés en réparation osseuse, car ils ont de bonnes propriétés mécaniques et disposent d'un recul clinique important. Les métaux purs ne sont employés que dans des applications bien précises. Les alliages métalliques couramment utilisés en clinique peuvent être classés en cinq groupes : les aciers inoxydables, les alliages à base de cobalt, les alliages de titane et les alliages à mémoire de forme. Nous ne présenterons ici que les matériaux utilisés dans les dispositifs de réparation osseuse.

Un point essentiel dans l'utilisation des vis en chirurgie est d'avoir une forte différence entre la limite d'élasticité et la contrainte à la rupture. Ceci est un avantage intrinsèque des métaux qui possèdent une déformation plastique importante avant rupture.

#### a) Les métaux purs

---

De nombreux métaux purs ont été utilisés par les chirurgiens au cours de l'histoire (fer, argent, or), mais seuls le titane et l'or sont encore utilisés à l'heure actuelle en France pour respectivement les implants orthopédiques et le domaine dentaire.

Dans les premiers stades de son utilisation, le titane a été employé sous une forme commercialement pure qui est essentiellement un alliage dilué de titane et d'oxygène. Il y a plusieurs qualités de titane commercialement pur, contenant des quantités variables d'oxygène dissous et de fer; la résistance est d'autant meilleure que la teneur en oxygène est élevée. Le titane est un matériau hautement réactif, qui a la propriété de s'oxyder, que ce soit dans l'air ou dans l'eau. Il se recouvre alors d'une couche de passivation d'oxyde ( $\text{TiO}_2$ ), ce qui le rend peu sensible à la corrosion. La couche d'oxyde ne se compose pas seulement de dioxyde de titane, mais est constituée de plusieurs oxydes :  $\text{TiO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ti}_3\text{O}_4$ <sup>28</sup>. Au cours du temps, la couche d'oxyde se renforce en s'épaississant, son épaisseur est estimée entre 300 et 600 nm. En raison de cette passivation, le titane montre une meilleure résistance à la corrosion que la plupart des autres métaux employés dans le domaine médical.

Cette couche d'oxyde est à l'origine de son excellente ostéointégration<sup>29</sup>. En effet, il est admis que le titane pur est extrêmement bien toléré par des tissus et n'induit ni effets toxiques, ni réactions inflammatoires<sup>30, 31</sup>. Sa couche d'oxyde lui confère sa très grande résistance à la corrosion vis-à-vis des chlorures, éléments caractéristiques en milieu biologique. En raison de cette passivation, le titane montre une qualité de rapport avec les tissus environnants comparable à celle des céramiques dont la biocompatibilité est parfaite. La biocompatibilité du titane est particulièrement bonne vis-à-vis de l'os qui croît en contact direct avec sa surface et assure ainsi une très bonne transmission des contraintes mécaniques.

Le titane est utilisé couramment en chirurgie orthopédique et cranio-maxillo-faciale comme vis, plaque, clou ou broche, mais également dans le rachis comme cage de fusion, ou dans la ligamentoplastie comme vis d'interférence.

## b) Les alliages

---

### • Les aciers inoxydables

La combinaison originale du fer et du chrome dans un alliage a été développée en 1821. L'acier inoxydable a été utilisé en chirurgie orthopédique dès 1926. Du molybdène a été ajouté dans les années 1940 et l'alliage n'a guère changé depuis. L'acier inoxydable est encore largement utilisé pour les matériels d'ostéosynthèse. Les deux types de dommages contre lesquels il doit être prémuni sont la fatigue mécanique et la corrosion localisée. Les aciers inoxydables contiennent entre autres (% massiques) :

- 17 à 22 % de chrome pour améliorer la résistance à la corrosion ;
- 9 à 16 % de nickel qui renforce la résistance à la corrosion ;
- 2 à 4,2 % de molybdène ;
- 0,03 % à 0,08 % de carbone.

La structure et les propriétés des aciers dépendent de la teneur en carbone, des présences ou non d'éléments ajoutés ainsi que des traitements thermiques ou physicochimiques subis (trempe, recuit, revenu). Les aciers inoxydables peuvent être classés en trois catégories de base, en fonction des phases caractéristiques présentes à température ambiante :

- les aciers austénitiques, comportant une phase solide appelée austénite, qui est une solution solide de fer  $\gamma$  avec du carbone au taux de 2 % ou moins et qui est stabilisée par la présence de nickel.
- les aciers ferritiques, à basse teneur en nickel, pour lesquels la phase austénitique formée à haute température se dissocie en fer  $\alpha$  et carbone à basse température ; Ils ont de grandes qualités mécaniques en termes de ductilité, mais contenant peu de nickel, ils sont inutilisables en chirurgie en raison de leur faible résistance à la corrosion.
- les aciers martensitiques, pour lesquels chauffage et refroidissement rapides peuvent entraîner une transformation de phase non diffusionnelle interne de la phase austénitique en une nouvelle phase, la martensite, sans précipitation. Ces aciers ont une dureté très élevée mais ils sont trop fragiles pour être utilisés comme implant de fixation osseuse.

Les aciers austénitiques sont les seuls qui répondent à un usage chirurgical. Leur bonne résistance à la corrosion est liée à la présence à la fois de nickel et de chrome et à leur structure cristalline austénitique (système cubique faces centrées). En effet alors que le fer, élément majoritaire des aciers, se corrode fortement, la présence de chrome lui confère une résistance accrue à la corrosion, assurée par la croissance en surface d'une couche protectrice d'oxyde de chrome. La passivation se produit spontanément à l'air libre et/ou par traitement chimique. Si cette couche passive vient à être rompue, soit mécaniquement, soit chimiquement par des agents très corrosifs, l'acier perd en partie son caractère inoxydable. La corrosion de ce matériau peut alors entraîner un relarguage ionique qui peut provoquer une inflammation chronique. Enfin, contrairement à plusieurs autres, cet acier n'est pas ferromagnétique, ce qui permet à des patients porteurs de ce type de matériau de se soumettre aux examens d'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les spécifications pour les aciers inoxydables chirurgicaux, habituellement appelés 316L, sont typiquement de 17 à 20 % pour le chrome, 12 à 14 % pour le nickel, 2 à 4% pour le molybdène avec un maximum de 0,03 % pour le carbone. L'acier 316L (ASTM F 138, F 139, grade 2) demeure le plus utilisé en pratique. Le L dans sa désignation correspond à sa basse teneur en carbone (*Low carbon content*) qui lui assure une meilleure tenue en corrosion, une teneur supérieure à 0,03 % augmentant le risque de formation de carbure dont la précipitation réduit la formation de la couche protectrice d'oxyde de chrome  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .

Cependant il est connu depuis de nombreuses années que des ions nickel sont relargués dans le corps humain, et peuvent conduire à des irritations localisées et des infections, même en l'absence de mécanisme de corrosion. La toxicité et le risque de dermatite de contact du nickel et de ses sels ont déjà été bien reportés<sup>32</sup>.

Malgré ses inconvénients l'acier inoxydable reste le matériau le plus utilisé pour les implants temporaires. Il est utilisé comme plaque, vis, clou en chirurgies orthopédique et cranio-maxillo-faciale. L'acier 316L est actuellement l'acier orthopédique le plus courant.

- **Alliages à base de cobalt (alliages Co-Cr)**

Ils ont été utilisés pour la première fois en dentisterie vers le milieu des années 1930 et leur bonne résistance à la corrosion, jointe à leur tolérance par les tissus, ont conduit à leur introduction en chirurgie orthopédique quelques années après. Ces matériaux sont habituellement dénommés alliages cobalt-chrome et il en existe deux types principaux : l'alliage Co-Cr-Mo, qui est habituellement coulé, et l'alliage Co-Ni-Cr-Mo, qui est

habituellement forgé. Dans l'ostéosynthèse, ces matériaux présentent une moins bonne ostéointégration que le titane, leur module élastique est deux fois plus élevé que ce dernier (Tableau 2) et enfin leur prix est significativement plus élevé.

- **Alliages de titane**

Parmi les alliages à base de titane, on peut citer l'alliage Ti6Al4V qui contient 90% de titane, 6% d'aluminium et 4% de vanadium. Son module d'Young ( $\approx 100\text{GPa}$ ) est deux fois inférieur à celui des aciers et des alliages Cr-Co ; mais il reste dix fois supérieur à celui de l'os<sup>33</sup>.

Alliages et métaux	Module d'élasticité (GPa)	Résistance à la rupture en traction (MPa)	Densité (g/cm <sup>3</sup> )
Acier 316 L	190	590 - 1350	8.8
Co-Cr-Mo	210 - 250	650 - 1900	7.8
Titane	110	760	4.5
Ti-6Al-4V	116	960 - 1100	4.4

Tableau 2 : Principales caractéristiques des métaux et alliages inoxydables utilisés en médecine<sup>9</sup>.

Malgré leur excellente tenue mécanique (Tableau 2), les métaux présentent de nombreux inconvénients pour l'utilisation en clinique. Leur module d'élasticité étant plus élevé que celui de l'os, l'implant supportera la plus grande partie des efforts (phénomène de stress shielding). L'os étant moins sollicité, il va se résorber, pouvant entraîner un descellement de l'implant. Les métaux engendrent la présence d'artefacts avec l'imagerie par résonance magnétique, rendant l'intervention de révision compliquée. De plus, une seconde intervention peut être nécessaire pour retirer l'implant. En effet, une fois la consolidation osseuse totale obtenue, l'ablation du matériel d'ostéosynthèse est systématique chez l'enfant, habituelle mais non obligatoire pour les adultes<sup>34</sup>. Enfin les métaux sont des matériaux qui ne forment pas de liaisons avec l'os, à l'exception du titane.

---

## A.II.2 Les polymères biorésorbables

Historiquement, la biocompatibilité a d'abord été appréhendée de manière passive, avec le développement de matériaux les plus inertes possibles vis-à-vis des tissus. Aujourd'hui, on s'oriente vers l'utilisation de matériaux dits biorésorbables. En effet, les implants permanents dans l'organisme occasionnent le plus souvent une inflammation chronique correspondant à la réponse de l'organisme au corps étranger. Elle se traduit par la formation d'une couche de tissu fibreux peu vascularisée. La biorésorbabilité de certains polymères permet de s'affranchir de la seconde opération chirurgicale liée au retrait de l'implant. Enfin les polymères sont des matériaux radio-translucides, permettant ainsi le suivi médical par imagerie.

Un polymère est dit biorésorbable s'il est susceptible après implantation dans l'organisme d'être totalement dégradé sous forme de produits simples, éliminés par les voies métaboliques. La biodégradabilité des polymères est liée à la présence de liaisons



chimiques hydrolysables. Par ordre décroissant de vitesse de dégradation, il s'agit des fonctions anhydride, ester, uréthane, ortho-ester et amide.

Les polymères aujourd'hui les plus développés pour ce type d'applications appartiennent aux familles des :

- polyesters aliphatiques : polylactide (PLA), polyglycolide (PGA), polycaprolactone (PCL), polydioxanone (PDO) et poly-β-hydroxybutyrate (PHB) ;
- polyanhydrides ;
- poly(ortho-esters) ;
- polymères naturels : protéines (collagène) ou polysaccharides (chitosane).

*In vivo*, le PLA et le PGA subiront donc une hydrolyse progressive de la fonction ester, qui entrainera respectivement la libération d'acide lactique et glycolique. L'élimination de l'acide lactique se fait par oxydation et retour à l'acide pyruvique soit sur place, soit dans le foie. Dans les cellules, l'acide glycolique donne un acide aminé : la glycine. Les molécules de glycine sont soit utilisées pour la protéosynthèse, soit transformées en acide pyruvique<sup>35</sup>.

Les polyesters synthétiques résorbables ont été adoptés dans la chirurgie dans les années 1970 comme sutures et dispositifs de fixation osseuse<sup>36</sup> et restent parmi les polymères synthétiques les plus largement utilisés. Aujourd'hui la majorité des fabricants d'implants propose une gamme de produits en polymère biorésorbable, à base de copolymère d'acide lactique, de polyacide glycolique ou encore de polydioxanone.

a) Les principaux polyesters utilisés dans la réparation osseuse

• **Le poly (ε-caprolactone) (PCL)**  $-\text{[(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-O]}_n\text{-}$

Ce polymère est obtenu par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone. Ce polymère est semi-cristallin et sa dégradation peut prendre entre 2 et 3 ans *in vivo* (Tableau 3)<sup>37</sup>.

• **Le polyacide glycolique (PGA)**  $-\text{[CH}_2\text{-CO-O]}_n\text{-}$

Le PGA est un polyester aliphatique produit par polymérisation en chaîne après l'ouverture du cycle de la glycolide (Fig. 19). Ce polymère est semi-cristallin avec un taux de cristallinité d'environ 45-55%<sup>37</sup>, il se dégrade plus rapidement que les polylactides entre 6 et 12 mois *in vivo*<sup>38</sup> et possède un module élastique plus élevé (Tableau 3)<sup>39</sup>.

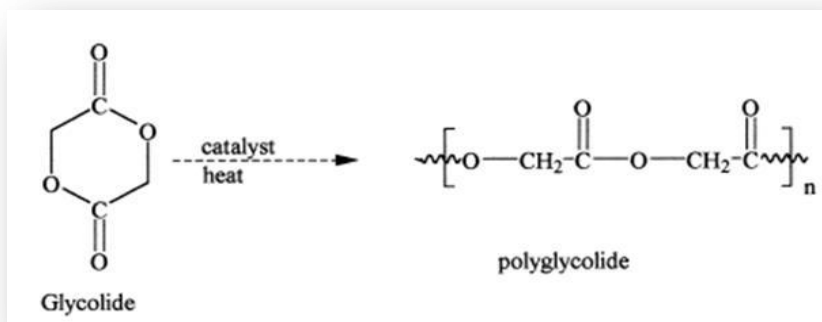


Figure 19 : Synthèse du polyacide glycolique (PGA)<sup>40</sup>.

• **Le polyacide lactique-co-glycolique**  $-\text{[CH(CH}_3\text{)-CO-O]}_x\text{-[CH}_2\text{-CO-O]}_y\text{-}$

Le PLGA est synthétisé à partir des deux homopolymères PLA et PGA. Ce copolymère permet de combiner les propriétés des deux homopolymères et donc d'adapter le temps de résorption. En effet le PGA est plus rapidement biodégradé ce qui permet d'optimiser la biodégradation en maîtrisant les quantités des deux polymères.

• **Le polyacide lactique**  $-\text{[CH(CH}_3\text{)-CO-O]}_n\text{-}$

Le polyacide lactique (PLA) est un polyester aliphatique linéaire thermoplastique. L'acide lactique est une molécule chirale, qui possède deux formes énantiomères, D et L qui possèdent des propriétés chimiques intrinsèques similaires mais des configurations différentes (Figure 20).

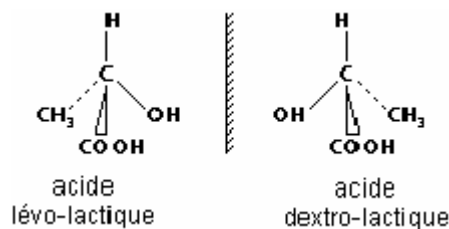


Figure 20. Schéma des molécules d'acide lactique

L'acide lactique-L peut être trouvé dans le métabolisme des glucides de tous les organismes vivants, c'est un produit final du métabolisme anaérobie du glucose. Il est donc un produit de dégradation du lactide absolument non-toxique.

L'acide lactique-L peut être produit par des procédés chimiques ou par fermentation des amidons de maïs, de betterave ou de pomme de terre<sup>41</sup>. L'amidon extrait de ces ressources est successivement transformé en dextrose par hydrolyse enzymatique puis en acide lactique par un procédé de fermentation. L'acide lactique obtenu à partir du pétrole brut est habituellement obtenu dans sa forme racémique, et dans un mélange équimolaire des énantiomères L et D, alors que la voie utilisant les ressources naturelles aboutit à une forte proportion de L.

Le poly(L-lactide) PLLA : polymère thermoplastique semi-cristallin avec un taux de cristallinité pouvant aller jusqu'à 40%<sup>42</sup>, caractérisé par une forte résistance en traction et un module élastique élevé, mais par un temps de dégradation *in vivo* supérieur à 2 ans (Tableau 3).

Le poly (DL-lactide) PDLLA : polymère amorphe caractérisé par une faible résistance en traction, qui se dégrade plus rapidement *in vivo* que le PLLA entre 12 et 16 mois (Tableau 3).

Le copolymère d'acide poly (L-lactique-co-D,L-lactique) 70/30 : Ce copolymère est composé de 70% d'acide poly(L-lactique) et de 30% de mélange racémique acide poly(D, L-lactique) 50/50. Ce copolymère est donc composé de 85% de PLA lévogyre (L) et de 15% de PLA dextrogyre (D).

Polymère	Tg(°C)	Tf(°C)	Module élastique (GPa)	Résistance en traction (MPa)	Elongation à la rupture (%)	Temps de dégradation <i>in vivo</i> (mois)
PGA	35-40	225-230	12,8		15-20	2-12
L-PLA	60-65	173-178	1,3(t) 6,5 (f) 5 (c)	154	5-10	>24
DL-PLA	55-60	Amorphe	1,9 (c)	40-50	3-10	12-16
P(L,DL)LA 70:30	55-59	Amorphe	0,4	74	19	36*
PLGA	45-55	Amorphe	1,4-2,8	41-55		1-12 ajustable
PCL	-60	55-60		23	300-500	>48

Tableau 3. Propriétés de quelques polymères biodégradables<sup>38, 43-48</sup> (\*dégradation complète *in vivo* dans le condyle fémoral de moutons<sup>49</sup>). Les données présentées sur le P(L,DL)LA 70 :30 sont des données Boehringer.

Le composite étudié dans la thèse ayant une matrice en polyacide lactique, nous décrirons plus en détail dans la partie suivante le polyacide lactique : ses voies principales de synthèse et son mécanisme de dégradation.

## b) Le polyacide lactique

### • Les voies d'élaboration du polyacide lactique

Il existe deux voies principales de synthèse du PLA :

- La synthèse par polycondensation de l'acide lactique

Cette méthode consiste à réaliser une polycondensation directe de l'acide lactique. Mais cette voie d'élaboration ne permet pas d'obtenir un polymère de haute masse moléculaire<sup>41</sup>. De plus, l'eau produite durant le procédé de polymérisation doit être retirée et habituellement de hautes températures et des réactions de longue durée sont requises<sup>42</sup>.

- La synthèse par ouverture de cycle du lactide

Cette voie de synthèse est la plus courante et la plus étudiée (Fig. 21). Elle offre l'avantage d'un contrôle précis de la structure chimique du polymère et permet surtout d'obtenir des masses molaires élevées<sup>41</sup>.

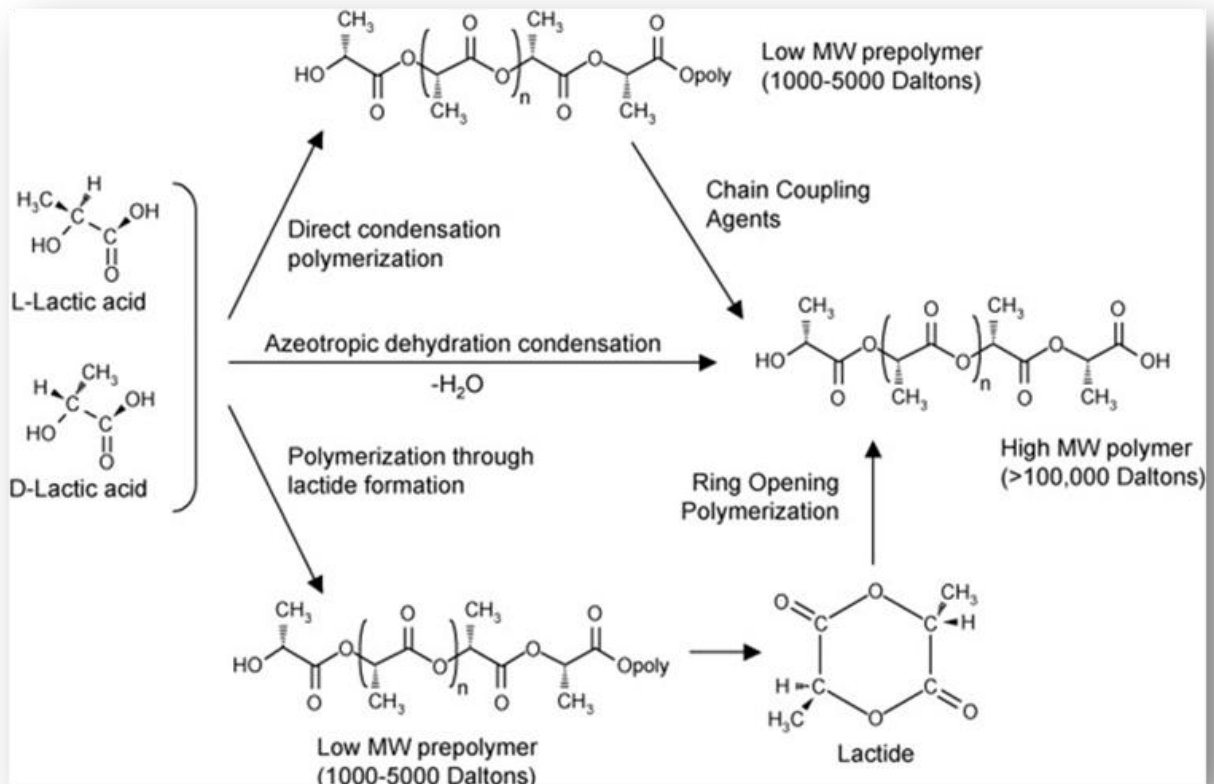


Figure 21 : Synthèse du polyacide lactique (PLA)<sup>50</sup>.

Le diester cyclique, appelé lactide, est obtenu en pré-polymérisant prépolymérisé l'acide lactique en un polyacide lactique de faible masse moléculaire afin que le milieu ne soit pas trop visqueux et que l'eau puisse être éliminée. Ce prépolymère est ensuite dépolymérisé en lactide, au moyen de procédés combinés d'oligomérisation et cyclisation. Le mélange racémique d'acide lactique L et D génère trois types différents de lactide, deux formes actives optiquement et une mésoforme (Fig. 22).

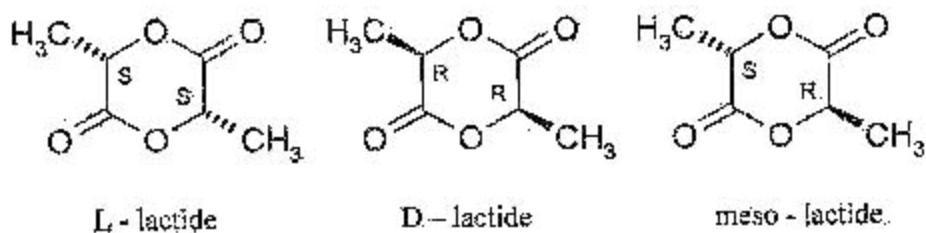


Figure 22. Les trois énantiomères du lactide<sup>41</sup>.

Au cours de la polymérisation en polylactide, les lactides bruts doivent être sans eau résiduelle. L'ouverture du cycle est catalysée par des composés organométalliques. Un catalyseur couramment utilisé est le tin(II) octoate.

- **La dégradation du polyacide lactique**

Nous évoquerons ici la dégradation hydrolytique du polyacide lactique lors de son immersion dans un fluide biologique. Bien que ce phénomène soit recherché, il se doit d'être contrôlé. En effet la tenue mécanique et chimique du matériau doit être maintenue jusqu'à réparation du tissu osseux.

- Le mécanisme de dégradation

La dégradation hydrolytique des polyesters dépend intimement de leur caractère semi-cristallin.

Si l'on considère un polyester semi-cristallin, sa dégradation peut se schématiser de la façon suivante : l'eau diffuse au sein du matériau par le biais de la phase amorphe. En présence d'eau, les liaisons ester du polymère s'hydrolysent plus ou moins rapidement suivant les conditions environnementales (température, acidité ou basicité du milieu...). Il en résulte une diminution de la taille des chaînes polymères. L'hydrolyse se produit beaucoup plus lentement (environ 20 fois) dans la phase cristalline que dans la phase amorphe. Le taux de cristallinité est par conséquent un élément déterminant dans la vitesse de dégradation (vitesse de diffusion et temps de dégradation). Les chaînes amorphes assurent la liaison entre les lamelles cristallines au sein du matériau. Ainsi, au cours du processus de dégradation, la rupture des chaînes amorphes induit le relargage de fragments cristallins dans le milieu de dégradation.

Si l'on considère maintenant un polyester totalement amorphe. La diffusion de l'eau au sein d'un matériau amorphe est plus rapide que dans un matériau semi-cristallin puisque la pénétration de l'eau se fait à travers la phase amorphe.

Par contre, dans les deux cas il existe un gradient de dégradation entre le cœur et l'écorce du matériau. Un échantillon massif se dégrade plus rapidement à cœur, en raison de la présence d'une plus grande concentration en groupements acide carboxylique (liés à l'avancement de la réaction d'hydrolyse) qui catalysent la réaction de dégradation. Cette réduction de masse moléculaire est rapidement suivie d'une perte des propriétés mécaniques. Par exemple, la résistance à la rupture en traction dépend de la masse macromoléculaire moyenne en nombre ( $M_n$ ). Quand  $M_n$  devient trop faible, inférieure à la macromoléculaire critique, les propriétés mécaniques chutent de façon importante selon la relation suivant<sup>51</sup> :

$$\sigma = A - \frac{B}{M_n}$$

Où  $\sigma$  correspond à la résistance à la rupture en traction, A la valeur de la résistance quand  $M_n = \infty$  et B est une constante dépendante du polymère.

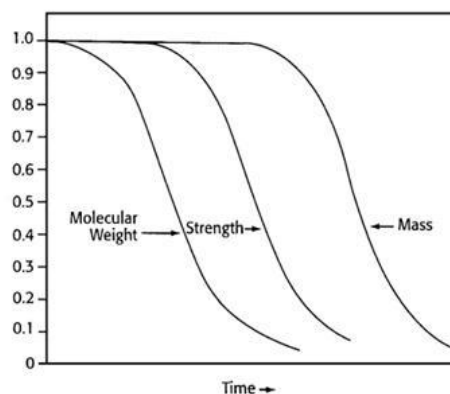


Figure 23 : Courbes montrant les séquences de réduction de masse moléculaire moyenne en poids, de résistance mécanique et de masse globale au cours du temps<sup>40</sup>.

La dégradation volumique a lieu quand la vitesse de pénétration de l'eau dans le matériau excède la vitesse de conversion du polymère en fragments solubles. Ce qui se traduit par une érosion dans tout le matériau.

Certains auteurs ont observé une dégradation hétérogène du matériau<sup>46, 52-54</sup>. Elle serait liée au processus de réaction/diffusion. L'eau pénètre dans l'échantillon, entraînant le clivage hydrolytique des liaisons esters. Chaque liaison ester clivée forme un nouveau groupe carboxylique terminal qui accélère l'hydrolyse des liaisons esters par autocatalyse. Seuls les oligomères qui sont solubles dans le milieu aqueux environnant peuvent s'échapper de la matrice. Les oligomères solubles qui sont proches de la surface peuvent être libérés avant la dégradation totale, alors que ceux qui sont localisés à l'intérieur de la matrice restent piégés et contribuent totalement à l'effet autocatalytique. Cette différence de concentration en groupes acides résulte en la formation d'une peau composée de polymère moins dégradé. Un schéma a été proposé par Grizzi et al.<sup>54</sup> pour représenter les phénomènes successifs de réaction/diffusion qui ont lieu pendant la dégradation hydrolytique de dispositifs de grande taille selon le modèle de la dégradation hétérogène (Figure 24).

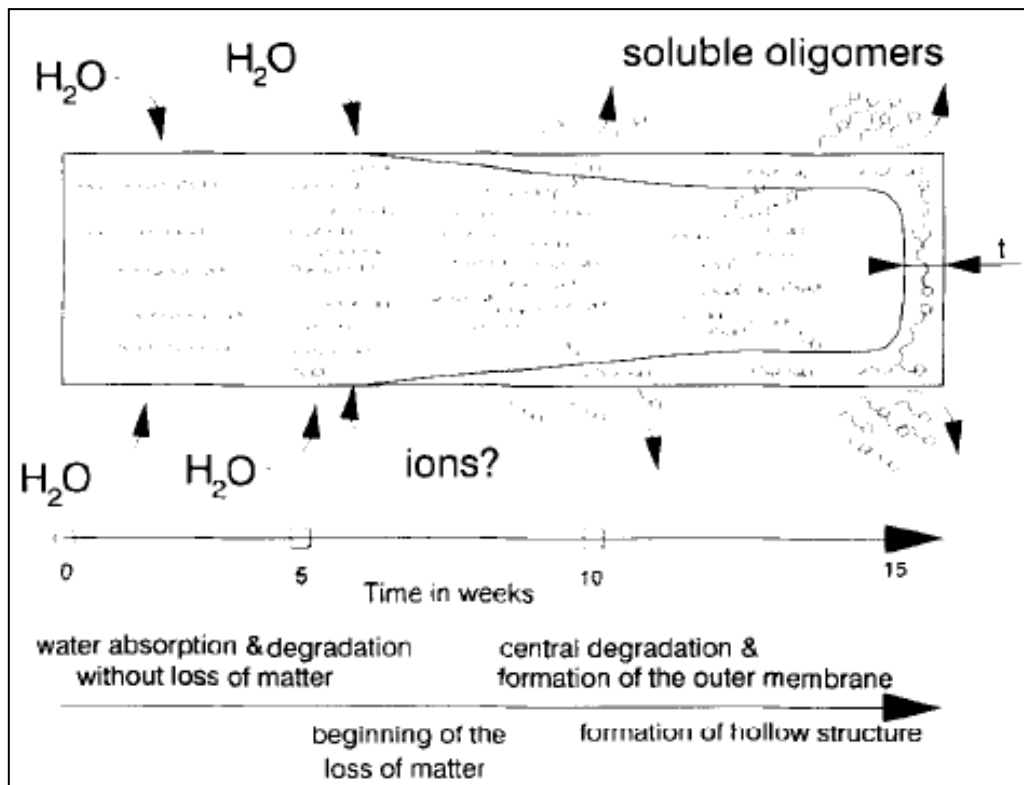


Figure 24 : Schéma représentant les phénomènes successifs de diffusion-réaction ayant lieu au cours de la dégradation hydrolytique<sup>54</sup>.

- Les paramètres influençant la vitesse de dégradation

Le mécanisme de dégradation dépend de nombreux facteurs, parmi ceux-ci on peut citer : la structure et la composition chimique, la polydispersité, la masse moléculaire, les conditions de synthèse, les facteurs physicochimiques, le mode de stérilisation, le stockage, le site d'implantation<sup>55</sup>.

**La cristallinité du polymère** ralentit sa vitesse de dégradation. Li *et al.*<sup>52</sup> ont montré que le PLA 100% cristallin (obtenu par recuit du PLLA) se dégrade moins vite que le PLA 100% amorphe (obtenu par trempe du PLLA) en termes de perte de masse. De la même façon, Saha *et al.*<sup>56</sup> ont montré que l'incorporation de petites quantités d'unité de lactide-D au PLLA accélère sa dégradation *in vitro* pendant les 30 premières semaines. Après 30 semaines d'immersion, sa dégradation devient contrôlée uniquement par la quantité d'oligomères libérée, catalysant plus rapidement son hydrolyse.

**Le pH de la solution** peut également influencer la dégradation du polymère. La dégradation du PLA est très lente dans des conditions de pH neutres. Cependant, il se dégrade très rapidement dans les solutions de pH extrêmes (pH 1 et 13)<sup>57</sup>.

**Les cinétiques de dégradation *in vivo*** sont très variables d'une étude à l'autre. Elles dépendent beaucoup du site d'implantation, du modèle animal, des dimensions de l'implant et surtout du type de polymère implanté. Schwach *et al.*<sup>58</sup> ont également observé une dégradation hétérogène du P(DL)LA (Phusis, St-Ismier, France Mw moyenne > 230 kg/mol après moulage par injection) *in vivo* par implantation intraosseuse dans le mouton. Après

1 mois d'implantation, une différence de dégradation entre la surface et le centre de la vis était déjà visible. Cependant, malgré la rapide dégradation interne, 5 ans ont été nécessaires pour une dégradation complète de la vis. Mainil-Varlet et al.<sup>47</sup> ont également constaté ce phénomène de dégradation hétérogène en comparant la dégradation *in vivo* de plusieurs polymères dans le tibia de moutons. Après 1 an d'implantation, un implant en PLLA montre des signes de dégradation mineure, alors que des implants en copolymères de poly(L/D)LA et de poly(L/DL)LA montrent des signes importants de dégradation. Prokop et al.<sup>49</sup> ont observé que 3 ans étaient nécessaires pour une dégradation complète d'un implant cylindrique (long. : 25 mm ; diam. : 2 mm) en poly(L/DL)lactide (70/30) dans le condyle fémoral de mouton. Therin et al.<sup>46</sup> ont montré que le copolymère PLA37.5GA25 (75% DL-lactide – 25% glycolide) était totalement dégradé *in vivo* après 8 semaines d'implantation dans le muscle de lapins.

### **Comparaison des cinétiques de dégradation *in vitro* et *in vivo***

Therin et al.<sup>46</sup> ont comparé la dégradation du P(DL)LA et de copolymères PLAGA *in vitro* et *in vivo* par implantation dans les muscles dorsaux de lapins. Ils ont observé que la perte de masse moléculaire était assez similaire pour un même polymère *in vitro* et *in vivo*. Seule la libération d'oligomères solubles est apparue plus rapide *in vivo* pour le polymère P(DL)LA. Cette différence a été attribuée à l'effet des contraintes mécaniques plus importantes *in vivo*, liées aux mouvements musculaires.

#### **• La dégradation du polyacide lactique**

Les matériaux destinés à des applications médicales doivent être stérilisés avant utilisation. La stérilisation des polymères avant l'implantation peut modifier leurs propriétés physicochimiques et mécaniques, elle doit donc être prise en compte dans la fabrication de l'implant. La stérilisation par autoclave à chaleur humide est habituellement réalisée à des températures égales ou supérieures à 121°C, la stérilisation par chaleur sèche requiert des températures considérablement plus élevées pour inactiver efficacement les spores bactériennes. La susceptibilité des polyesters biorésorbable à l'hydrolyse et leur déformation à haute température excluent ces modes de stérilisation.

D'autres moyens de stérilisation seront possibles comme l'irradiation gamma ou la stérilisation à l'oxyde d'éthylène (EtO). Ces deux modes de stérilisation peuvent impacter sur les propriétés finales du polymère.

La stérilisation à l'oxyde d'éthylène nécessite une importante procédure de dégazage après stérilisation. L'oxyde d'éthylène est hautement réactif et peut agir comme un plastifiant, ce qui peut conduire à des changements de structure du polymère. Cette stérilisation est réalisée à des températures situées entre 50 et 60°C, donc au niveau de la température de transition vitreuse des polyacides lactiques. Mainil-Varlet et al.<sup>47</sup> ont stérilisé à l'éthylène oxyde des polyacides lactiques (PLLA, P(L,DL)LA et P(DL)LA), ils n'ont pas observé de perte de masse moléculaire significative après stérilisation. Des observations similaires ont été faites par Claes et al.<sup>59</sup> sur des vis en P(L,DL)LA 70 :30.

La stérilisation par irradiation gamma présente l'avantage de ne pas entraîner de résidus de stérilisation et cette technique ne nécessite pas de températures élevées. Cependant, des radiations, notamment à des doses supérieures à 20kGy, peuvent conduire à une dégradation significative des chaînes de polymère<sup>40</sup>. Gupta et al.<sup>60</sup> ont montré que la viscosité intrinsèque du PLLA diminue rapidement avec l'irradiation gamma en présence



d'air et d'azote et puis à partir de doses proches de 250 kGy elle augmente doucement. Cette augmentation de la viscosité est liée à deux phénomènes concomitants la scission des chaînes et la réticulation. Les propriétés mécaniques peuvent également chuter avec l'irradiation, notamment la résistance en traction. Le comportement du polymère peut même devenir fragile. Claes *et al.*<sup>59</sup> ont observé une réduction de plus de 60% de la masse moléculaire du polyacide lactique (L,DL) :70/30 après stérilisation gamma à 28 kGy à 45°C. De la même façon, Suuronen *et al.*<sup>43</sup> ont observé une réduction de plus de 75% de la masse moléculaire après stérilisation gamma du PLLA à une dose minimale de 25 kGy.

Malgré les nombreux avantages des polymères biorésorbables, ces matériaux présentent certaines limites pour application dans la réparation osseuse. Leur module élastique reste faible pour les applications souhaitées et ces matériaux ne sont pas « bioactifs », ils ne favorisent donc pas la repousse osseuse. En traumatologie, des vis et des plaques sont réalisées en polymère résorbable et ont été validées dans des indications pour lesquelles la résistance mécanique apparaît peu critique. On peut citer par exemple la fixation cartilagineuse dans les ostéochondrites\*, qui peut se faire par des broches en polymère biorésorbable<sup>61</sup>. Mais en pratique, les implants réalisés à partir de matériaux biorésorbables restent peu utilisés. Il est en effet difficile d'évaluer leur résistance dans le temps. Ces matériaux ne sont pas utilisés pour l'ostéosynthèse dans les diaphyses des os longs<sup>34</sup>. Ils sont utilisés principalement dans la chirurgie de la main et la chirurgie maxillo-faciale<sup>13</sup>, dans la réparation de petits fragments osseux ou de cartilage peu sollicités mécaniquement<sup>59</sup>. Les limites des matériaux polymères biorésorbables montrent l'intérêt d'associer à la phase organique une phase minérale bioactive qui va favoriser la repousse osseuse à la surface du matériau et augmenter son module élastique.

### **A.III. Les matériaux composites organiques-inorganiques**

Les matériaux composites résorbables denses organiques-inorganiques apparaissent comme une alternative intéressante aux matériaux actuellement utilisés. Ils ont l'avantage d'associer les propriétés de la matrice polymère et de la phase minérale. Ainsi, le caractère « bioactif » de la biocéramique favorise la repousse osseuse et permet ainsi une bonne ostéointégration de l'implant. La matrice polymère permet l'utilisation des procédés de plasturgie pour mettre en œuvre des implants de formes complexes. Et enfin l'addition de la phase minérale à la matrice organique permet d'obtenir un module élastique plus proche de celui de l'os.

Les céramiques dites « bioactives » ont été très largement étudiées depuis les années 1970, notamment pour leur utilisation comme substitut osseux. En effet, ces biocéramiques ont la capacité de former une liaison spécifique avec les tissus osseux environnants favorisant ainsi la repousse osseuse à leur surface. On peut distinguer plusieurs types de biocéramiques, les phosphates de calcium, les bioverres et certaines vitrocéramiques. Cependant, le caractère fragile des biocéramiques ne leur permet pas d'être utilisées seules comme système d'ostéosynthèse.

Parmi les phosphates de calcium, on peut citer l'hydroxyapatite (HAP),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et les phosphates tricalciques ( $\alpha$ - et  $\beta$ -TCP),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . L'hydroxyapatite est la céramique

bioactive la plus courante dans le domaine médical. Elle est très peu soluble et son taux de dégradation est très bas *in vivo*. L'HAP possède des carbonates comme l'HAP du corps humain et possède un ratio Ca/P (1.69) également très proche de celui de l'os humain (1.67). Ce rapport molaire Ca/P est très important car c'est lui qui gouverne la solubilité et l'acidité de l'apatite. La structure cristallographique de l'HAP est similaire à celle de l'apatite osseuse mais pas identique. Cette dernière est caractérisée par une déficience en calcium, phosphate et hydroxyle, par un désordre cristallin interne, et par des substitutions ioniques au sein du réseau d'apatite<sup>10</sup>. Le  $\beta$ -TCP est la forme stable à température ambiante du TCP. C'est un matériau ostéoconducteur très utilisé comme substitut osseux. Mais ses propriétés mécaniques, notamment son comportement fragile en rupture réduisent ses applications.

Parmi les vitrocéramiques, on peut citer la vitrocéramique d'apatite-wollastonite (AW) qui se présente sous forme de fins grains d'apatite et de wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ) liés par une interface de verre bioactif. Les propriétés de résistance mécanique et de dureté de cette vitrocéramique sont excellentes, ainsi que sa capacité de liaison à l'os<sup>62</sup>. Mais elle n'est pas utilisée dans les dispositifs de fixation osseuse car ses propriétés mécaniques (module élastique et résistance mécanique) sont beaucoup trop élevées par rapport à celles de l'os. Elle est plutôt utilisée comme coating dans les dispositifs de fixation du dentaire de l'orthopédie et du maxillo-facial<sup>63</sup> ou comme comblement osseux dans les disques intervertébraux et la crête iliaque<sup>64</sup>.

Les verres bioactifs sont composés principalement d'oxydes de silicium ( $\text{SiO}_2$ ), de sodium ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), de calcium ( $\text{CaO}$ ) et de phosphore ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Ils ont la propriété de développer à leur surface, quand ils sont immergés dans le milieu physiologique, une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAC) qui fait partie de la famille des apatites cristallisées. Cette couche d'HAC permet à l'implant de s'accrocher de manière stable au milieu extérieur. On peut trouver de nombreux types de bioverre variant par leur composition. Le Bioglass 45S5® découvert par L.L. Hench en 1969, de composition massique : 45% de  $\text{SiO}_2$ , 24.5% de  $\text{CaO}$  et  $\text{Na}_2\text{O}$  et 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (% massiques), est connu pour être le bioverre le plus bioactif<sup>65</sup>. Mais d'autres bioverres ont aussi été testés comme le bioverre G5 : 44.5%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 44.5% de  $\text{CaO}$ , 6%  $\text{Na}_2\text{O}$  et 5%  $\text{TiO}_2$  (% massiques)<sup>66</sup>, le bioverre S53P4 : 53% de  $\text{SiO}_2$ , 23% de  $\text{Na}_2\text{O}$ , 20% de  $\text{CaO}$  et 4% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (% massiques)<sup>67</sup> et le bioverre 13-93 : 6%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 12%  $\text{K}_2\text{O}$ , 5%  $\text{MgO}$ , 20%  $\text{CaO}$ , 4%  $\text{P}_2\text{O}_5$  et 53%  $\text{SiO}_2$  (% massiques)<sup>68</sup>.

Bonfield<sup>69</sup> fut un pionnier en développant un des premiers matériaux composites bioactifs polymère/céramique non résorbables, avec une matrice en polyéthylène haute densité chargée en hydroxyapatite (PEHD/HA). Ce composite appelé HAPEX<sup>TM</sup>, a été largement étudié du point de vue de ses propriétés mécaniques<sup>70</sup> et de sa biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*<sup>71</sup>. Des implants de l'oreille moyenne en HAPEX sont actuellement utilisés. Des matériaux composites PEHD/verre bioactif ont également été développés dans l'objectif d'améliorer l'intensité de la liaison de l'implant avec le tissu osseux.

De nombreuses études ont déjà été réalisées sur les matériaux composites résorbables, pour la plupart la phase minérale est en phosphate de calcium<sup>72-80</sup>. Le composite le plus étudié dans la littérature est le composite en polyacide lactique chargé en particules d'HA, pour lequel il existe le plus de recul clinique. Des études plus récentes s'intéressent aux composites denses comprenant une matrice biorésorbable chargée en verre bioactif<sup>66-68, 81-85</sup>. D'autres polyesters ont aussi été étudiés dans des systèmes composites comme les copolymères PLGA<sup>86</sup>, le PCL<sup>87</sup>, ou le polyhydroxybutyrate (PHB)<sup>88</sup>.

Les propriétés finales de l'implant dépendent de nombreux paramètres. Les plus évidents sont les caractéristiques du polymère, comme sa composition chimique, sa masse moléculaire, sa cristallinité. Les propriétés des céramiques jouent également un rôle important avec comme paramètres critiques : leur fraction volumique, leur taille, leur morphologie, leur dispersion et leur agglomération. Enfin les conditions d'élaboration auront un effet crucial sur les propriétés finales du matériau. Elles peuvent en effet influencer l'adhésion interfaciale et induire des porosités qui affecteront les propriétés du composite.

Après avoir décrit les différents modes d'élaboration des composites denses organiques-inorganiques, nous verrons plus en détail les caractéristiques mécanique, physicochimique et biologique des composites organiques-inorganiques étudiés dans la littérature. Pour des raisons de clarté et de facilité de présentation, tous les pourcentages représentant la fraction de phase minérale seront présentés en pourcentages massiques.

---

### **A.III.1 Les différentes voies de synthèse des composites organiques-inorganiques résorbables**

Nous distinguerons deux étapes : la préparation des granules composite et l'étape de mise en forme.

#### **a) Préparation des granules composite**

---

L'étape de préparation des granules de composite peut se faire de différentes manières :

- **Par mélange à chaud :**

Les granules de polymère et les particules de céramique peuvent être mélangés, agglomérés à l'état fondu ('compounding') dans un mélangeur, broyés et séchés<sup>69, 75, 83</sup>. Les paramètres de mélange varient d'une étude à l'autre. Aunoble et al.<sup>75</sup> mélangent le PLLA et les granules de  $\beta$ -TCP à une température de  $60\pm 5^\circ\text{C}$ , à l'air pendant 24 heures. Rich et al.<sup>83</sup> mélangent des granules de copolymère polycaprolactone-polyacide lactique-DL avec du bioverre à une température de  $100^\circ\text{C}$  pendant 5 min.

Blaker *et al.*<sup>81</sup> effectuent ce mélange et ce broyage à froid dans de l'azote liquide. Ceci permet d'éviter un risque potentiel d'hydrolyse des chaînes de polymère lors du mélange à l'état fondu. Cependant ce procédé pose le problème d'une mauvaise dispersion des charges dans le granule polymère.

- **Par mélange par voie solvant :**

Les granules de polymère et les particules de céramiques peuvent être mélangés en solution dans un solvant, précipités, puis broyés et séchés<sup>72, 87</sup>. Cette technique évite l'étape de chauffage du mélange qui peut catalyser l'hydrolyse des chaînes de polymères. Cependant le mélange en solution peut induire des contraintes de cisaillement importantes

sur les chaînes et finalement entraîner quand même une dégradation de la matrice polymère.

## b) Mise en forme du matériau composite

---

L'étape de mise en forme peut se faire de deux façons, soit par voie solvant, soit par voie thermomécanique.

### • Mise en forme directe par voie solvant

Dans le cas de la voie solvant, l'étape précédente d'élaboration des granules composite n'est pas nécessaire. Les charges sont réparties dans la matrice polymère en solution. Pour s'assurer d'une bonne répartition des charges, le mélange est agité pendant une durée variable. Puis le mélange est coulé et le solvant évaporé, à température ambiante ou par lyophilisation. Le film obtenu est ensuite pressé à chaud pour éliminer les porosités liées à l'évaporation du solvant et pour obtenir un film d'une épaisseur voulue.

La nature du solvant utilisé et la concentration du polymère en solution sont deux critères à optimiser. La voie solvant diminue les risques de perte de masse moléculaire; cependant elle ne permet pas d'élaborer des implants de formes complexes. Cette méthode est très souvent retrouvée dans la littérature car elle est facile à mettre en œuvre <sup>66, 89-91</sup>.

### • Mise en forme par voie thermomécanique

L'étape de mise en forme peut se faire, à partir des granules de composite, de différentes façons :

- Moulage par compression <sup>67, 83, 87</sup>.
- Moulage par injection <sup>75</sup>. Cette méthode de mise en forme permet d'obtenir des matériaux de formes complexes.
- Moulage par extrusion pour obtenir une préforme qui sera ensuite moulée par compression <sup>72, 81</sup> ou injection.

La figure suivante reprend les différentes étapes d'élaboration d'un composite dense par voie thermomécanique.

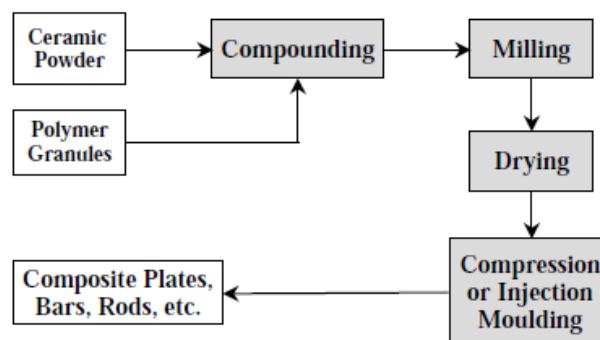


Figure 25. Elaboration de matériaux composites denses en utilisant les technologies de la plasturgie <sup>92</sup>.

c) Les problèmes liés à l'élaboration

---

L'avantage des procédés de plasturgie est qu'ils permettent d'élaborer des implants de formes complexes. Mais le problème majeur est le risque important de rupture des chaînes de polymère lié aux sollicitations (température, pression, cisaillement) lors de la mise en forme. Les polyesters ayant une stabilité thermique limitée, ils ont tendance à se dégrader en de petites fractions de polymères quand ils sont soumis à de hautes températures. La présence d'humidité pendant l'élaboration peut réduire la masse moléculaire et altérer les propriétés finales du polymère. Pour éviter la dégradation hydrolytique pendant la mise en forme, des précautions importantes doivent être prises. Le polymère doit notamment être séché avant la mise en forme. En effet, il a été montré que le séchage des granules de PLA est obligatoire avant sa mise en œuvre sous peine d'entraîner une hydrolyse importante<sup>93</sup>. Il apparaît clairement que pour un PLA non séché, l'augmentation du temps de séjour en extrudeuse conduit à une augmentation de l'indice de fluidité qui peut être directement mise en relation avec une diminution de la masse molaire. Au contraire, ce même PLA préalablement séché conserve un indice de fluidité constant, ce qui montre l'absence d'hydrolyse généralisée durant le temps de l'expérience.

Le risque de rupture des chaînes est accentué par la présence de particules de bioverre. Des pertes de masse moléculaire de la matrice chargée lors du procédé de mise en forme ont déjà été constatées par Blaker et al.<sup>81</sup>. Le contrôle des paramètres de mise en forme est crucial pour s'assurer de la conservation des propriétés du matériau, notamment les paramètres de pression, de température et de vitesse de refroidissement.

Enfin, la dernière étape de stérilisation du produit fini peut également hydrolyser les chaînes de polymère et modifier ainsi les propriétés mécaniques du matériau. Verheyen et al.<sup>74</sup> ont ainsi observé que la stérilisation à l'oxyde d'éthylène du composite PLLA/HA (30 et 50% massiques) modifiait significativement sa résistance en flexion (entre 10 et 40% en fonction du taux de charges) et la masse molaire moyenne viscosimétrique d'environ 10%.

---

### **A.III.2 Caractérisation des propriétés mécaniques**

Les composites développés pour la réparation osseuse doivent remplir une fonction mécanique. Ces matériaux étant destinés à remplacer temporairement une fonction osseuse, leurs propriétés mécaniques se doivent d'être les plus proches possible de celles de l'os. Nous présentons ici une synthèse bibliographique sur l'influence de l'ajout de céramique sur les propriétés mécaniques d'une matrice polymère biorésorbable.

a) Effet du taux de charges sur le comportement  
mécanique du composite

---

Très peu d'études ont été menées sur la caractérisation mécanique de composites denses en polyacide lactique chargés en particules de bioverre. Mais de nombreuses études

ont été réalisées sur la même matrice avec d'autres types de biocéramiques, notamment l'hydroxyapatite.

Il est difficile de comparer directement les propriétés mécaniques des composites entre les différentes études. En effet, beaucoup de paramètres divergent. On peut citer entre autres la différence entre la nature, la taille, le taux et la forme des charges ; mais également la nature et la masse moléculaire du polymère ainsi que le mode d'élaboration du composite. Le tableau suivant (Tableau 4) résume les différents paramètres des études réalisées sur les composites.

Auteurs	Matériaux	Mv (KDa)		Taille des charges
		Polymère	Composites	
Shikinami et al. <sup>72</sup>	PLLA/HA	220	202-215	3 µm
Verheyen et al. <sup>74</sup>	PLLA/HA	130	125-150	<45 µm
Gay et al. <sup>78*</sup>	PLLA/HA	104		80 nm
Blaker et al. <sup>81*</sup>	PDLLA/bioverre 45S5	260	221	4 µm
Kasuga et al. <sup>90*</sup>	PLLA/HAF	160		Long. : 40-150 µm Diam. : 2-10 µm
Niemela et al. <sup>68</sup>	SR-P(L,DL)LA/Bioverre 13-93			50-125 µm

*Tableau 4 : Résumé des paramètres de plusieurs composites étudiés dans la littérature (\* masse moléculaire en poids déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ; HAF : fibres d'HA).*

Tous les auteurs observent une augmentation du module élastique avec le taux de céramique, ce qui est cohérent puisque les charges ont une rigidité plus importante que la matrice (Figure 26). En effet le module élastique de l'HA a été évalué entre 80 et 120 GPa<sup>10, 64</sup> et celui du PLLA se situe entre 1 et 7 GPa<sup>38</sup>. Seuls Blaker et al.<sup>81</sup> observent une réduction du module élastique avec l'ajout de particules de bioverre. Cette réduction du module élastique doit être liée à l'importante perte de masse moléculaire observée lors du procédé d'élaboration.

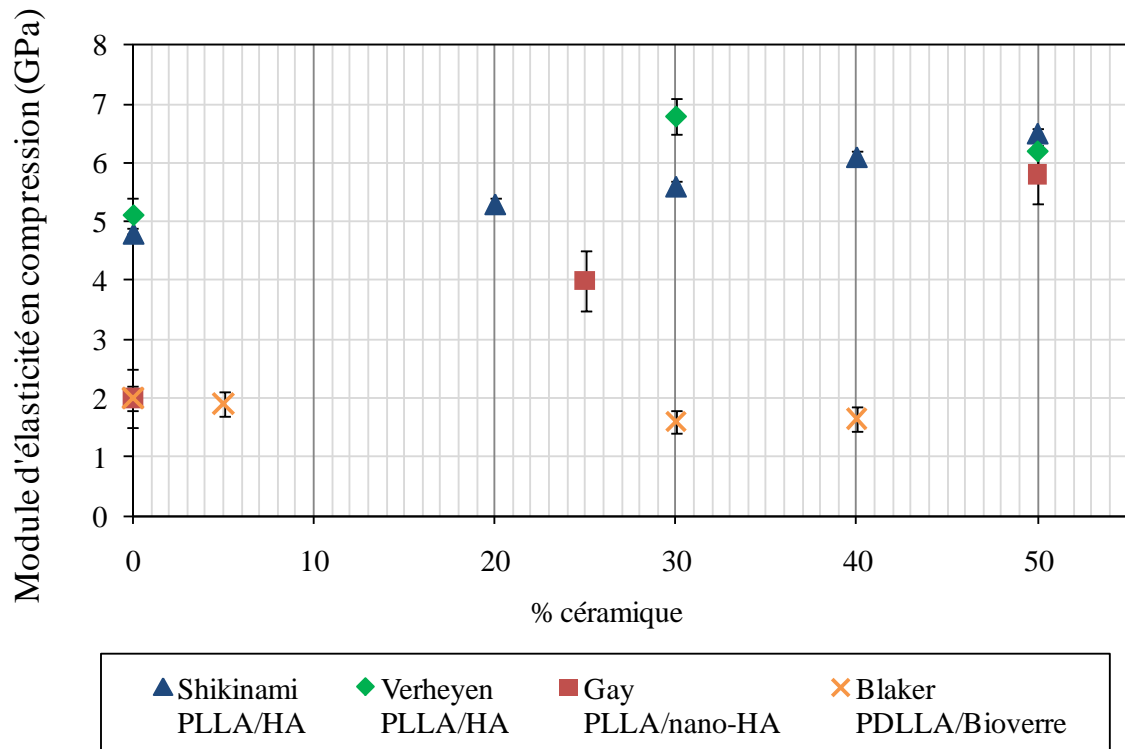


Figure 26 : Evolution du module d'élasticité en compression (GPa) en fonction du pourcentage massique en céramique<sup>72, 74, 78, 81</sup>.

De nombreux auteurs ont étudié l'évolution de la résistance du PLLA en fonction du taux en HA<sup>72, 74, 78, 90</sup>. Il est difficile de ressortir une tendance car les résultats sont assez différents. Mais on peut déjà constater une différence d'évolution entre les composites chargés en hydroxyapatite et ceux chargés en verre bioactif.

Il semblerait que les résistances mécaniques en compression soient plus affectées par le taux de charges dans le cas des composites chargés en verre bioactif (Fig. 27). En effet Blaker et al.<sup>81</sup> observent une diminution importante de la résistance en compression avec l'ajout de verre bioactif. Alors que l'ajout d'HA ne semble pas modifier de façon significative la résistance en compression (Fig. 27). Cette perte des propriétés mécaniques observée par Blaker et al. a été reliée à une perte de masse moléculaire lors du procédé d'élaboration. Niemelä et al.<sup>68</sup> ont étudié l'effet de l'ajout de particules de bioverre 13-93 (20, 30, 40 and 50 % en masse) sur les propriétés mécaniques du copolymère P(L,DL)LA. Ils ont également constaté une chute des propriétés mécaniques (résistance en flexion, déformation à charge maximale, résistance au cisaillement), mais également du module élastique, avec l'ajout de charges, et quelques soit le taux de charges.

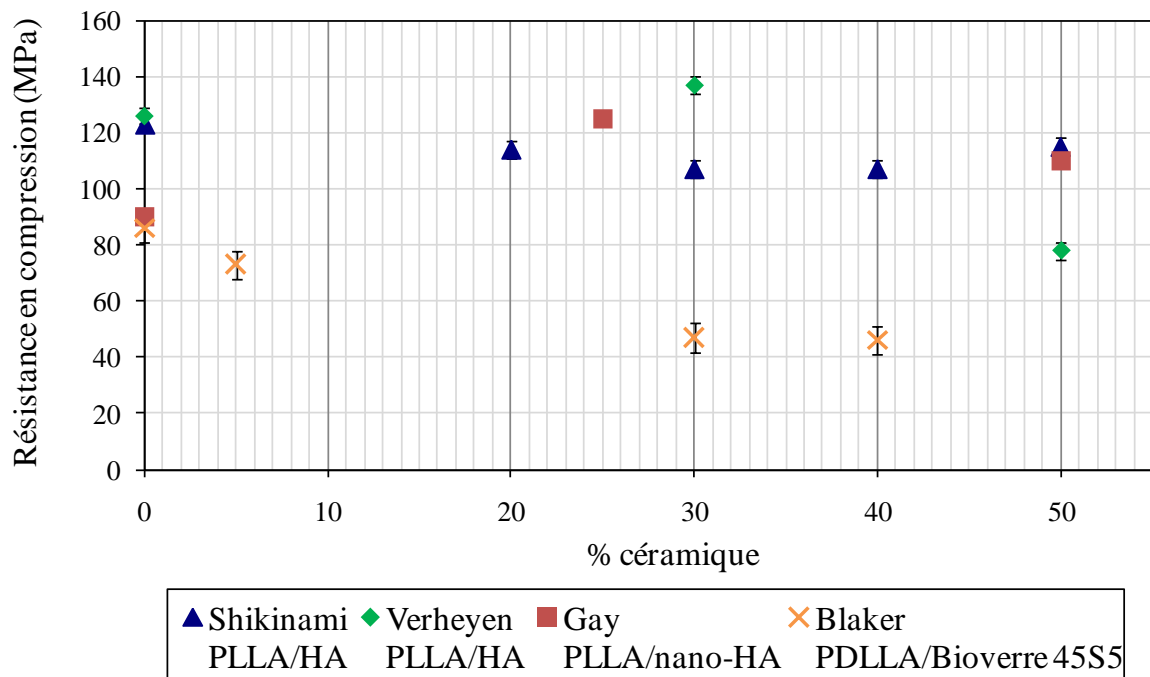


Figure 27. Evolution de la résistance en compression (MPa) en fonction du pourcentage massique en hydroxyapatite<sup>72, 74, 78</sup> et en bioverre<sup>81</sup>.

Seuls des composites chargés en phosphate de calcium ont été testés en traction, aucune étude ne semble avoir testé en traction un composite chargé en bioverre. L'évolution de la résistance en traction en fonction du taux de charges est stable comme en compression sauf au-delà d'un certain taux d'HA (20%<sup>72</sup> et 30%<sup>74</sup> en masse) (cf. Fig. 28). Ces résultats ne sont pas surprenants car une mauvaise interface charge/matrice peut provoquer de la cavitation autour des charges et une réduction des propriétés mécaniques en traction. Cependant les valeurs de résistance en traction affichées par Verheyen et al.<sup>74</sup> sont très faibles comparées à celles observées par Shikinami et al.<sup>72</sup>. Ce résultat peut s'expliquer par le type d'essai de traction effectué par Verheyen et al.<sup>74</sup>; en effet celui-ci réalise des essais de traction indirect sur des éprouvettes cylindriques conformément à la norme ASTM<sup>94</sup>.



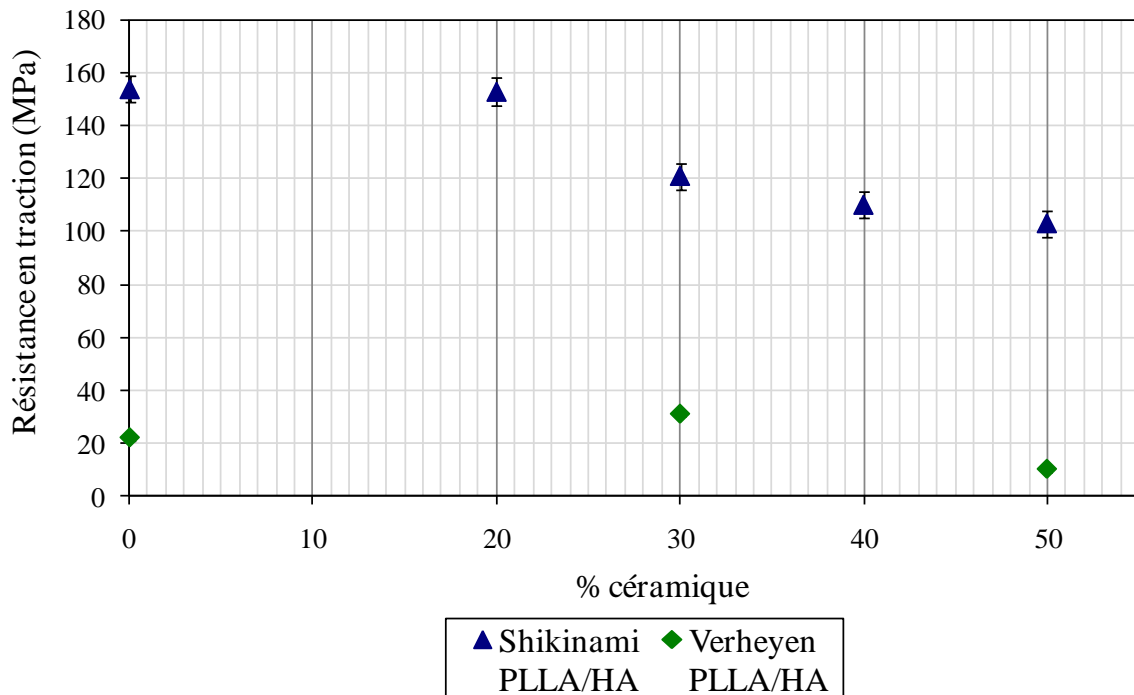


Figure 28 : Evolution de la résistance en traction (MPa) en fonction du pourcentage massique en hydroxyapatite<sup>72, 74</sup>.

### b) L'effet de la taille et de la forme des charges

La taille et la forme des particules de biocéramiques semblent avoir un impact sur les propriétés mécaniques du composite. Verheyen *et al.*<sup>74</sup> ont comparé les propriétés mécaniques de composites PLLA chargés à 30% en particules d'HA de tailles différentes : 5 et 45  $\mu\text{m}$ . Ils ont observé de meilleures propriétés mécaniques avec les particules de plus grande dimension. L'utilisation de plus petites particules crée plus de défauts dans le composite, ce qui par conséquent réduit ses propriétés mécaniques.

De nombreuses études tendent à montrer que les charges nanométriques entraîneraient une rupture fragile du composite<sup>78, 95</sup>. La figure suivante (Figure 29) présente les courbes contrainte déformation typiques du PLLA et des composites chargés à 25 et 50% en nanoparticules d'HA<sup>78</sup>. On remarque que le composite présente une rupture fragile quand le taux de charges est trop élevé.

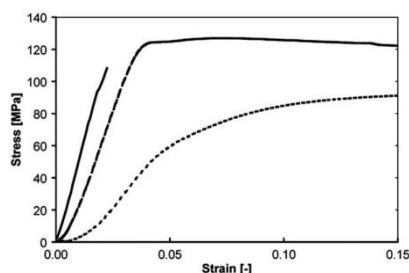


Figure 29. Courbes de contrainte déformation en compression du PLLA (ligne en pointillé), du composite PLLA+25% HA (ligne en trait tireté) et du composite PLLA+50% HA (ligne pleine)<sup>78</sup>.

Des résultats similaires ont été observés par Todo *et al.*<sup>95</sup>. Ils ont étudié l'effet de la forme des particules d'HA sur le comportement en rupture du composite PLLA/HA chargé à 10% en HA (Figure 30). Les composites chargés avec des particules micrométriques ont montré une déformation locale ductile de la matrice et une décohésion interfaciale, alors que le composite chargé en particules nanométriques montre une surface de rupture fragile.

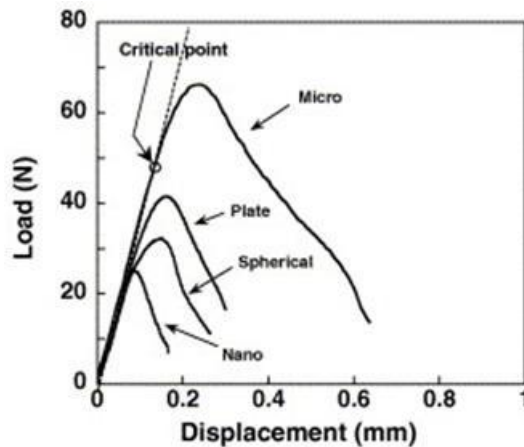


Figure 30. Courbes de force déplacement d'un test de rupture de composites PLLA/HA (10%)<sup>95</sup>.

Ce changement de comportement dans le cas de charges nanométriques, malheureusement peu discuté dans le cas de charges nanométriques, pourrait être lié à la formation d'agglomérats de charges liés à leur taille nanométrique. Ces agglomérats créant des défauts dans la structure, ils favoriseraient la rupture fragile du matériau. Enfin une autre explication serait peut être que les chaînes de polymère en contact avec les particules seraient plus dégradées notamment en raison de la plus grande surface spécifique de ces particules, comparativement à des particules micrométriques.

### c) L'auto-renforcement

Les polymères mis en forme par extrusion peuvent ensuite être auto-renforcés par étirement. L'étirement de ses chaînes dans une direction donnée, entrainera un fort degré d'orientation moléculaire de celles-ci. Cette orientation induit un comportement anisotrope du matériau, avec de meilleures propriétés dans la direction d'étirement (rigidité, déformation à la rupture). Mais ce procédé peut engendrer des porosités, qui vont réduire la résistance mécanique du matériau final<sup>68</sup>. L'autre inconvénient de ce procédé d'auto-renforcement, est qu'il ne permet pas d'élaborer des dispositifs de forme complexe.

En 2005, Niemela *et al.*<sup>68</sup> ont réalisé des composites en P(L,DL)LA 70/30 auto-renforcés et chargés en bioverre 13-93 (20, 30, 40 et 50% en masse). Ils ont constaté que l'addition de particules de bioverre réduisait la résistance en flexion du composite. Mais la déformation à la rupture en flexion augmente avec l'addition de bioverre. La propriété la plus intéressante est que l'auto-renforcement du composite le rend ductile. Concernant la bioactivité, Niemela *et al.* ont constaté que seuls les composites ayant des porosités ouvertes, laissant apparaître des particules de bioverre, ont la capacité de former une couche d'apatite en surface. Ces mêmes auteurs ont réalisé une étude de dégradation *in vitro* sur le composite PDLLA/  $\beta$ -TCP

(20%) auto-renforcé<sup>79</sup>. Ils ont constaté que la résistance en flexion, le module élastique et la résistance au cisaillement du composite étaient plus faibles que ceux du polymère seul. La diminution de ces propriétés mécaniques serait liée à la création de porosités au sein du matériau lors du procédé d'étirage. En revanche, ils ont constaté une diminution des propriétés mécaniques *in vitro* plus lente pour le composite que pour le polymère. Cette rétention des propriétés mécaniques serait liée à la présence de ces porosités. Au cours de la dégradation, celles-ci s'interconnectent, permettant la diffusion des produits de dégradation acides du polymère en dehors du matériau, limitant ainsi le processus d'autocatalyse.

L'attribution de l'effet des charges sur le comportement mécanique n'est pas encore bien identifiée. Toutes les études montrent que l'ajout de charges augmente le module élastique du matériau composite sauf Blaker et al.<sup>81</sup>. Cependant en matière d'évolution de la résistance mécanique et de comportement à la rupture, les résultats sont très variables. Les matériaux étudiés étant différents ainsi que le taux, la nature, la taille des charges et les procédés d'élaboration, il est difficile d'attribuer l'effet direct des charges sur l'évolution des propriétés mécaniques des composites.

Nous avons en revanche constaté deux effets distincts des charges sur la matrice polymère, en fonction notamment de la nature des charges.

- Un effet direct : l'ajout de charges, quelque soit la nature des charges, crée la présence de défauts dans la structure qui peuvent fragiliser le matériau. Cette fragilisation peut être liée à la fois à la concentration des contraintes au niveau des charges. Mais aussi à la présence d'une interface entre les charges et la matrice qui entraîne une décohésion charge/matrice. Ces deux effets favorisent ainsi la rupture du matériau.
- Un effet indirect : lié au procédé d'élaboration des matériaux composites. Il a été notamment constaté que le bioverre relargue des ions alcalins qui favorisent l'hydrolyse des chaînes de polymère et réduit ainsi sa masse moléculaire.

Les matériaux composites chargés en phosphate de calcium ne subissent donc que « l'effet direct » des charges, alors que les composites chargés en bioverre subissent à la fois « l'effet direct » et « l'effet indirect ».

---

### **A.III.3 Caractérisation de la bioactivité et de la dégradation in vitro des composites**

#### **a) Etude de bioactivité**

---

- **La bioactivité des verres bioactifs**

La liaison de l'os aux verres bioactifs est le résultat d'une série de transformations physicochimiques complexes<sup>62</sup>. Ces phénomènes ont été largement étudiés depuis les années 1970<sup>65</sup>. La première étape correspond à des échanges ioniques rapides se

produisant entre les ions alcalins du biomatériau ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) et les ions hydroniums du fluide biologique ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Le milieu devient alcalin et la silice soluble migre dans la solution. Les liaisons Si-O-Si se rompent pour former des liaisons silanols Si-OH à l'interface. Puis les groupes Si se recondensent en surface, conduisant à la formation d'une couche riche en  $\text{SiO}_2$  sous forme d'hydrogel. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  migrent à travers la couche de gel vitreux et une couche riche en  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  se forme sur le gel vitreux. Le film amorphe riche en  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  croît par incorporation des phosphates de calcium solubles dans la solution, cristallise par incorporation d'anions  $\text{OH}^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  de la solution, conduisant à la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée. Un schéma illustrant ces différentes étapes est présenté ci-dessous (Figure 31). Enfin les protéines s'absorbent à la surface sur la couche d'hydroxyapatite carbonatée, favorisant l'adhésion de cellules préostéoblastiques qui vont se différencier en ostéoblastes et proliférer, puis former une matrice cristallisée permettant la croissance osseuse.

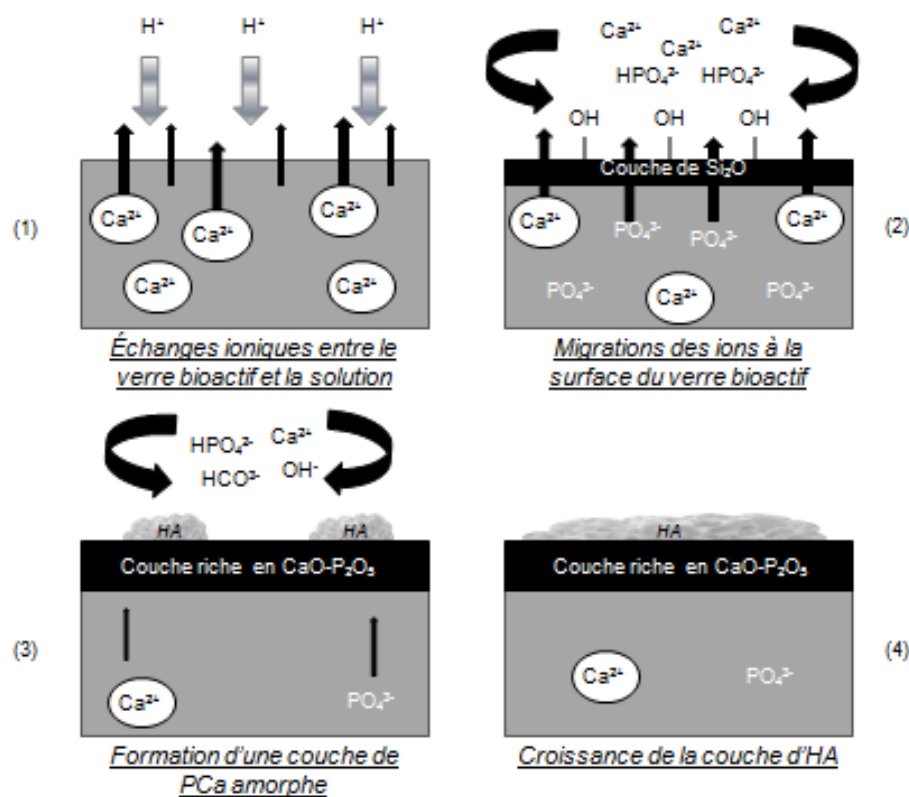


Figure 31 : Schéma illustrant les différentes étapes de la formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface du verre bioactif.

Cette couche d'apatite formée sur les verres bioactifs peut être reproduite dans une solution acellulaire simulant les fluides biologiques (SBF : Simulated Body Fluid) avec des concentrations en ions presque équivalentes à celles du plasma sanguin humain (Tableau 5) conformément à la norme ISO 23317<sup>96</sup>. Cette apatite ainsi formée possède une composition et une structure très similaire à la phase minérale de l'os.

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma sanguin	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.5

Tableau 5 : Concentrations ioniques en mM du plasma sanguin humain et du SBF tamponné à pH 7.4 avec du tris-hydroxyméthylaminométhane et du HCl à 1M<sup>64</sup>.

- **Mécanisme de formation de la couche d'HA sur les composites**

Après immersion d'un composite polymère biorésorbable – bioverre dans une solution de SBF, le pH augmente<sup>84, 86</sup>. Ceci est lié à l'échange ionique entre les ions Ca<sup>2+</sup> du verre bioactif et les ions H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> provenant de la solution. Ceci provoque une augmentation du pH favorisant la formation de noyaux d'apatite à la surface du verre bioactif. Cette augmentation de pH est d'autant plus importante que le taux de verre bioactif est élevé. Lu et al.<sup>86</sup> ont observé que le pH de la solution de SBF pouvait dépasser 7,7 après une semaine d'immersion du composite PLGA chargé à 50% en verre bioactif 45S5.

Il a également été constaté que la concentration en calcium dans la solution augmente au début de l'immersion, puis diminue progressivement au fur et à mesure du dépôt phosphocalcique. Cette diminution de la concentration en calcium serait liée à la formation d'apatite. Les chaînes de polymères présentes à la surface du composite sont hydrolysées et des groupes carboxyliques sont formés. Ces groupes réactifs ont la capacité de complexer les ions silice et calcium, qui peuvent ainsi constituer des sites de nucléation pour la formation de l'hydroxyapatite.

Il est connu que le verre bioactif seul forme une couche amorphe de phosphate de calcium après environ un jour d'immersion dans le SBF. Cette couche est ensuite cristallisée après trois jours d'immersion<sup>65</sup>. La cinétique de formation de la couche de phosphate de calcium apparaît retardée dans le système composite. En effet, Lu et al.<sup>86</sup> ont observé la formation d'une couche amorphe de phosphate de calcium sur le composite PLGA chargé à 20% en verre bioactif 45S5 après 14 jours. Et cette couche cristallise sur le composite chargé à 50% après seulement 21 jours. Certains auteurs ont également observé que la formation de phosphate de calcium se faisait initialement à partir de particules de verre bioactif émergentes en surface du composite<sup>66</sup>.

- **Effet du taux et de la taille des charges sur la cinétique de formation de l'HA**

Le dépôt de phosphate de calcium et sa cristallisation à la surface du composite est d'autant plus rapide que le taux de verre bioactif et le rapport surface/volume des particules sont élevés<sup>67, 83, 86</sup>.

Lu et al.<sup>86</sup> ont comparé la cinétique de cristallisation de l'apatite à la surface de composites PLGA/verre bioactif 45S5 chargés à différents taux (10, 25 et 50%). La vitesse de cristallisation est d'autant plus rapide que le taux de verre bioactif dans le composite est élevé. Seul le composite chargé à 50% a révélé la formation d'une couche d'apatite cristallisée après 14 jours d'immersion dans le SBF.

Jaakkola et al.<sup>67</sup> ont comparé la cinétique de formation de la couche de phosphate de calcium sur des composites poly (ε-caprolactone-co-DL-lactide)/verre bioactif S53P4 chargés à différents taux (40, 60 et 70%) et avec différentes tailles de particules (inférieures à 45 µm et entre 90 et 135 µm). Ils ont constaté que la concentration en ions calcium dans la solution

après 6 heures d'immersion était plus importante dans le cas du composite ayant les particules les plus grandes. Ils en déduisent que le dépôt de phosphate de calcium est plus rapide avec les plus petites particules de verre bioactif. De même la nucléation et le dépôt de phosphate de calcium ont eu lieu plus rapidement sur les composites ayant les taux de verre bioactif les plus élevés.

Rich *et al.*<sup>83</sup> sont arrivés aux mêmes constatations en comparant la cinétique de formation de l'apatite sur le même composite. Les premiers signes de précipitation de phosphate de calcium ont été observés après 24 heures d'immersion sur le composite chargé à 60% avec les particules de verre bioactif les plus petites (<45µm). Mais après 1 semaine, un dépôt a été observé sur tous les autres composites.

## b) Biodégradation du composite *in vitro*

---

La vitesse de dégradation du polymère résorbable dans l'organisme est une caractéristique importante du composite qui doit être contrôlée et adaptée aux exigences du site d'implantation. Pour cela, la dégradation du composite peut être simulée *in vitro* dans une solution de composition similaire aux fluides biologiques à une température égale à celle de l'organisme. Cette dégradation restera cependant très différente de celle ayant lieu *in vivo*. En effet dans l'organisme, des enzymes peuvent également participer à la dégradation du polymère et les fluides biologiques sont en constant renouvellement. Les problèmes de pH observés *in vitro* ne seront pas directement retrouvés *in vivo* car l'organisme tamponne le pH. Enfin des contraintes mécaniques sont appliquées sur l'implant *in vivo*, ce qui accélère sa dégradation.

### • Mécanisme de dégradation

La dégradation des polyesters biodégradables se fait par scission aléatoire des chaînes. L'hydrolyse de la liaison ester est un processus autocatalytique lié à la formation de groupes terminaux d'acide carboxylique. Quand le verre bioactif réagit avec le fluide biologique, un environnement local alcalin est créé qui va tamponner le milieu rendu acide par les produits de dégradation du polymère<sup>83</sup>. Lu *et al.*<sup>86</sup> ont suivi l'évolution du pH de la solution de SBF après immersion du composite PLGA-verre bioactif 45S5 (0, 25 et 50%). Ils ont observé une augmentation légère du pH les 7 premiers jours pour toutes les compositions. Celui-ci passe de 7.5 à 7.6 environ pour le polymère et le composite chargé à 25%, alors qu'il passe de 7.65 à 7.72 pour le composite chargé à 50%. Zhou *et al.*<sup>84</sup> ont observé une évolution comparable du pH de la solution de SBF après immersion du composite PLLA-verre bioactif 35S5 (10%). Le pH de la solution a augmenté de 7.3 à 7.56 en 7 jours.

De manière générale de nombreux auteurs ont observé que la présence du verre bioactif va accélérer la dégradation du polymère<sup>66, 83</sup>. Certains auteurs avancent l'hypothèse de fissures formées entre le polymère et les particules de céramique, qui augmenteraient la surface disponible pour une attaque hydrolytique<sup>66, 83</sup>. L'eau pénètre à l'interface entre les particules et la matrice par capillarité et par les microfissures. De même la taille des charges, donc le rapport surface/volume des particules pourrait influencer l'absorption d'eau. Rich *et al.*<sup>83</sup> ont observé que le pourcentage d'eau absorbée par le composite P(CL/DL-LA) était plus important quand le rapport surface/volume des particules était plus élevé, quelque soit le taux de charges (40 ou 60%). Ils ont ainsi constaté une absorption plus importante dans le

cas de particules de taille inférieure à 45 µm par rapport aux particules dont la taille se situe entre 90 et 135 µm. Enfin, l'absorption de l'eau par le verre bioactif est favorisée par le caractère hydrophile du polymère.

- **Perte de masse moléculaire du polymère**

L'eau absorbée va entraîner l'hydrolyse des chaînes, qui va provoquer une perte de masse moléculaire. L'évolution de la masse moléculaire en fonction du temps d'immersion a été suivie dans certaines études. Mais l'effet des charges sur la dégradation de la matrice n'est pas encore bien identifié.

Dans le cas de composites chargés en particules d'hydroxyapatite, il semblerait que l'introduction de charges dans la matrice polymère accélérerait sa dégradation. Shikinami *et al.*<sup>72</sup> ont montré que la diminution de la masse moléculaire viscosimétrique du PLLA est d'autant plus rapide que le taux d'HA est important (20, 30, 40 et 50%). Un temps de latence de 5 semaines est observé pour le polymère et le composite chargé à 20%, avant que la masse moléculaire ne diminue. Cette période de latence est corrélée avec la dégradation hétérogène observée sur le polymère. Ceci conforte l'hypothèse d'un mécanisme de dégradation différent entre le polymère et les composites. Dans le cas du polymère seul, la présence de groupes méthyles hydrophobes ralentit la dégradation. Dans le cas de composites à forte charge en HA, l'eau peut pénétrer via les interfaces entre le polymère et les charges et aller vers le centre de l'éprouvette.

Mais des résultats différents ont été observés par Verheyen *et al.*<sup>74</sup>. Ils observent que la masse moléculaire viscosimétrique des composites PLLA/HA chargés à 30 et 50% diminue moins rapidement que celle du polymère seul.

Li *et al.*<sup>97</sup> ont suivi l'influence de la nature des charges sur la vitesse de dégradation d'un scaffold en PLGA. Cette étude ne peut être reliée directement aux précédentes puisqu'il s'agit ici d'un système poreux et non dense. Cependant la comparaison entre l'HA et le verre bioactif sur la dégradation de la matrice apporte une information pertinente. Ils ont constaté que la perte de masse moléculaire est similaire pour le polymère seul et les scaffolds chargés en HA et bioverre 45S5 dans les premiers jours d'immersion. Mais très rapidement une différence apparaît : l'ajout de bioverre ralentit la perte de masse moléculaire alors que l'addition d'HA l'accélère. L'évolution du pH de ces solutions a été suivie au cours du temps. Et il s'avère que le scaffold PLGA/ bioverre réussit à tamponner le milieu grâce à la forte libération d'ions alcalins. Alors que le scaffold chargé en HA connaît une diminution linéaire du pH jusqu'à 5,5 en 50 jours. Similairement, Boccaccini *et al.*<sup>98</sup> ont montré que l'addition du Bioverre 45S5 à un scaffold en PLGA ralentissait la dégradation du polymère, par rapport au polymère seul.

- **Chute des propriétés mécaniques**

Verheyen *et al.*<sup>74</sup> ont observé que les résistances en flexion du PLLA et du composite PLLA/HA chutent très rapidement après immersion dans un tampon phosphate (PBS). En trois semaines, la résistance en flexion a perdu 50% de sa valeur initiale. Cette chute est d'autant plus rapide que le taux de charges est élevé. Puis elle stagne entre 3 et 6 semaines pour le composite chargé à 30% alors qu'elle continue encore à chuter pour le polymère et le composite chargé à 50%.

Des résultats différents ont été observés par Shikinami *et al.*<sup>72</sup>. L'évolution de la résistance est similaire à celle observée pour la masse moléculaire viscosimétrique. Les

résistances mécaniques du polymère seul et du composite chargé à 20% restent stables pendant 10 semaines, puis diminuent. Alors que celle des composites chargés de 30 à 50% connaît une diminution immédiate. Elle chute de 50% après plus de 50 semaines pour les composites à fort taux de charges. Dans tous les cas les composites conservent une résistance en flexion supérieure à 200 MPa après six mois. Ce qui laisse un temps suffisant au matériau pour créer une liaison à l'os.

La différence de comportement avec l'étude de Verheyen s'explique, comme précédemment évoqué, par la différence de masse moléculaire initiale. En effet celle-ci est deux fois plus élevée dans l'étude de Shikunami et al.<sup>72</sup>. Ce qui explique également la valeur initiale de résistance mécanique beaucoup plus élevée dans cette étude.

- **Perte de masse**

Navarro *et al.*<sup>66</sup> ont suivi la perte de masse du composite P(L,DL)LA 95/5 chargé à 50% en verre bioactif G5 avec le temps d'immersion dans du SBF. Le composite subit une perte de masse dès les premières semaines d'immersion, jusqu'à 25% de perte de masse en 3 semaines, puis une légère reprise de masse est notée (Figure 32). La perte de masse initiale est liée à la présence à l'interface entre les particules et la matrice et aux fissures qui vont permettre la pénétration plus rapide de l'eau, qui va venir hydrolyser les chaînes de polymères. En comparaison le polymère et le bioverre ne perdent pas en masse au cours des 6 semaines d'immersion. Le gain de masse observé pour le composite après 3 semaines, serait attribué à la précipitation de phosphate de calcium à la surface du matériau.

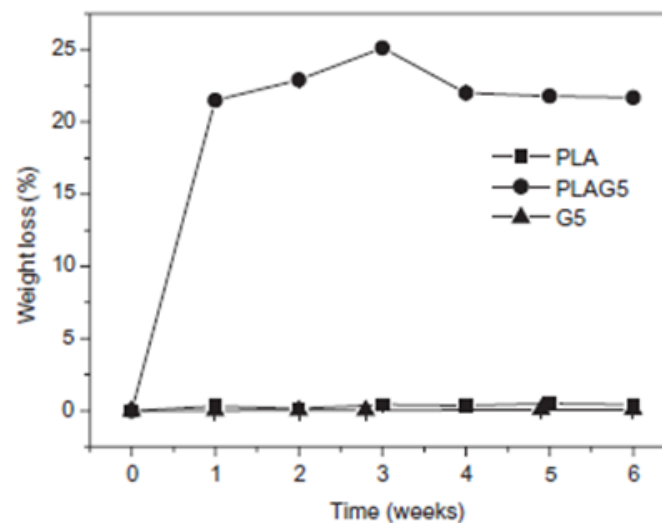


Figure 32 : Pourcentage de perte de masse en fonction du temps d'immersion (en semaines) du verre bioactif G5, du PLA et du composite PLAG5<sup>66</sup>.

Qiu et al.<sup>99</sup> ont également observé une perte de masse du composite poly(octanediol-citrate)/HA dès les premières semaines d'immersion dans le PBS. Les composites chargés à 40, 50 et 60% en HA ont perdu environ 12% en masse après 20 semaines d'immersion (Figure 33). Mais ils n'observent pas de gain de masse ultérieur.



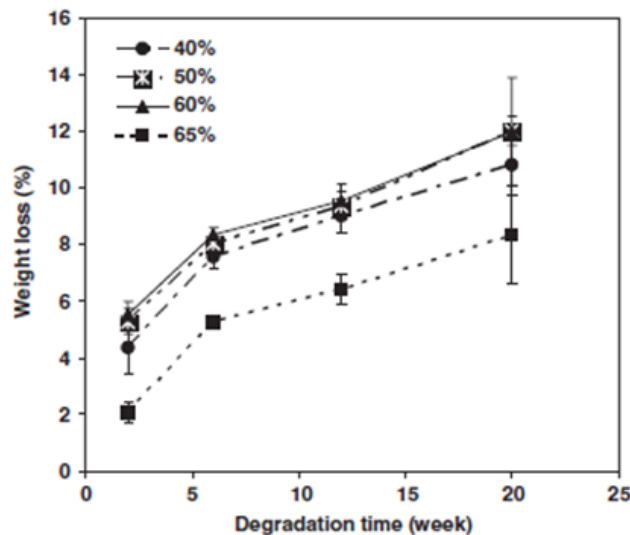


Figure 33 : Pourcentage de perte de masse en fonction du temps d'immersion dans le PBS pour différents composites poly(octanediol-citrate)/HA chargés à 40, 50, 60 et 65% en masse<sup>99</sup>.

### A.III.4 Biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*

L'objectif des études de biocompatibilité *in vitro* est de vérifier, dans un premier temps, que le matériau n'est pas toxique vis-à-vis des cellules (cytotoxicité), puis que celles-ci se développent normalement et présentent un métabolisme inaltéré. Ces études sont un pré-requis indispensable au développement de tout biomatériau. L'ensemble des études *in vitro* menées sur les composites polymères résorbables/céramiques ont été réalisées soit sur des scaffolds<sup>100-103</sup> soit sur des films obtenus par coulage en voie solvant<sup>85, 104, 105</sup>. Très peu d'études ont été réalisées sur des matériaux denses obtenus par voie thermique<sup>75</sup>.

#### a) Biocompatibilité *in vitro*

- **Effet du verre bioactif sur la prolifération cellulaire**

Les études tendent à montrer que l'ajout de verre bioactif favorise la prolifération cellulaire. Blaker *et al.*<sup>100</sup> ainsi que Verrier *et al.*<sup>101</sup> ont observé une augmentation de la prolifération de cellules humaines d'ostéosarcome MG63 avec l'ajout de Bioverre 45S5 (5 ou 40%) par rapport au polymère seul. De même, Helen *et al.*<sup>102</sup> ont observé une augmentation de la prolifération des cellules humaines du noyau fibreux sur les composites PDLLA/bioverre 45S5 chargés à 5 ou 30%. Cette augmentation de la prolifération cellulaire est d'autant plus importante que le taux de verre bioactif est élevé.

Cependant, un taux trop élevé de verre bioactif peut affecter la prolifération cellulaire. Lu *et al.*<sup>86</sup> ont remarqué que le composite PLGA chargé à 10% en verre bioactif 45S5 permettait une croissance et une différenciation ostéoblastique plus élevées comparativement au polymère seul ou au composite chargé à 50%. L'augmentation de pH observée avec le composite chargé à 50% pourrait en être la cause. Un taux trop élevé de verre bioactif

entraîne une libération trop importante d'ions alcalins, d'où l'augmentation du pH incompatible avec une bonne viabilité cellulaire.

Le  $\beta$ -TCP semble également favoriser la prolifération cellulaire d'autant plus que son taux est élevé. Aunoble *et al.*<sup>75</sup> ont en effet constaté une prolifération des cellules ostéogéniques d'autant plus importante que le taux de  $\beta$ -TCP est important. Mais cette biocéramique étant moins réactive que le verre bioactif, elle n'est pas soumise aux problèmes de pH occasionnés par le fort relargage alcalin du verre bioactif.

Un taux maximal de verre bioactif (<50%) semble donc être important pour conserver son effet positif sur la prolifération cellulaire. Il est important de mentionner que Lu *et al.*<sup>86</sup> n'ont pas prétraité les matériaux dans du milieu de culture, comme cela a été fait par tous les autres auteurs<sup>100, 101, 104, 106</sup>. Ce prétraitement des matériaux dans le milieu de culture évite un relargage d'ions alcalins trop important lors de la mise en culture.

- **Effet du verre bioactif sur la minéralisation du tissu osseux**

La phosphatase alcaline (PAL) est capable d'agir sur la minéralisation du tissu osseux en hydrolysant les esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation. Cette enzyme synthétisée par les ostéoblastes constitue ainsi un très bon marqueur de la maturation des ostéoblastes. L'ostéocalcine est une hormone sécrétée par les ostéoblastes, elle augmente la concentration locale de calcium extracellulaire et le fixe sur le tissu ostéoïde\*.

#### L'effet des charges sur l'activité de la phosphatase alcaline

La culture de cellules ostéoblastiques sur le composite PLGA/bioverre 45S5 (10%) induit une meilleure activité de la PAL, comparée à la culture sur le polymère seul ou le composite chargé à 50%<sup>86</sup>. Yang *et al.*<sup>106</sup> ont fait la même observation. L'activité de la phosphatase alcaline est significativement plus importante sur le composite PDLLA chargé à 5% en bioverre 45S5 par rapport au polymère seul et au composite chargé à 40% dans le cas du matériau prétraité.

Tsigkou *et al.*<sup>104</sup> ont également observé une meilleure activité de la PAL lors de la culture de cellules ostéoblastiques sur le composite PDLLA/bioverre 45S5 par rapport au polymère seul. Mais aucune différence n'est notée en fonction du taux de charges (5 ou 40%). Des résultats similaires ont été observés par Aunoble *et al.*<sup>75</sup> lors de la culture de cellules ostéogéniques sur les composite PLLA/ $\beta$ -TCP chargés à 30 ou 60%.

#### L'effet des charges sur la production d'ostéocalcine

Tsigkou *et al.*<sup>104</sup> ont observé une synthèse d'ostéocalcine significativement plus importante avec l'ajout de charges par rapport au polymère seul, mais uniquement dans le cas du composite chargé à 5%.

L'incorporation de bioverre dans une matrice polymère semble accroître l'activité de la PAL et la production d'ostéocalcine. Cependant il semblerait qu'un taux trop élevé de bioverre ne favoriserait plus cette activité des ostéoblastes.

- **Effet du verre bioactif sur la production de polysaccharides du tissu conjonctif**

La production de glycosaminoglycanes (GAG) semble être augmentée avec l'ajout de bioverre 45S5 (5 et 30%) par rapport au PDLLA seul<sup>102</sup>.

- **Effet du verre bioactif sur la production de collagène**

Les études tendent à montrer que la production de collagène serait accélérée, voire augmentée avec l'ajout de bioverre.

Wilda *et al.*<sup>85</sup> ont mesuré la quantité de collagène déposé à la surface du film et celui soluble dans le milieu de culture. Après 2 semaines de culture, le taux de collagène déposé est plus important sur le composite chargé à 30% par rapport au composite chargé à 5% et au polymère seul. Mais après 4 semaines de culture, il n'y a pas de différence significative entre les composites et le polymère. Concernant le collagène libéré dans le milieu, jusqu'à 2 semaines de culture aucune différence significative n'est observée. Mais après 4 semaines de culture, la quantité de collagène produite par les composites est significativement plus importante que pour le polymère seul.

Des résultats semblables ont été observés par Aunoble *et al.*<sup>75</sup> par culture de cellules ostéogéniques sur les composites PLLA/ $\beta$ -TCP (30 ou 60%). La synthèse de collagène I augmente avec le taux de  $\beta$ -TCP après 24 et 72h de culture.

D'une manière générale, toutes les études ont montré une bonne biocompatibilité *in vitro* des matériaux composite. La morphologie des cellules osseuses en contact avec le matériau est normale pour toutes les études. Mais il est difficile de comparer toutes ces études entre elles. En effet de nombreux paramètres diffèrent : la nature et le nombre de cellules en culture, les matériaux étudiés et leur mode d'élaboration, et surtout la concentration en bioverre. Ce dernier paramètre est le plus important, car comme on l'a souligné, des taux trop élevés de bioverre pourraient entraîner une hausse de pH trop importante. Un prétraitement adapté des échantillons à fort taux de charges pourrait être alors une solution.

## b) Biocompatibilité *in vivo*

---

- **L'effet de l'ajout de charges sur l'ostéointégration**

Des études *in vivo* à long terme sur les composites PLLA chargés en phosphate de calcium ont montré leurs excellentes propriétés biologiques en particulier d'ostéoconduction. Les résultats tendent à montrer que l'ajout de céramiques bioactives réduit l'inflammation et favorise la repousse osseuse.

Yasunaga *et al.*<sup>107</sup> ont notamment montré que l'intensité de la liaison implant/os était significativement accrue dans le cas du composite PLLA/HA par rapport au polymère seul. Des résultats similaires ont été observés par Verheyen *et al.*<sup>74</sup>.

Aunoble *et al.*<sup>75</sup> ont constaté que les implants en PLLA étaient en contact avec quelques travées osseuses après 6 mois d'implantation dans le fémur de lapins, alors que dès 3 mois d'implantation les implants en composite PLLA/ $\beta$ -TCP (60%) sont en contact direct avec le tissu osseux.

Après 6 mois d'implantation dans le condyle fémoral de lapins, les composites PLLA chargés en HA (30 et 40%) sont en contact direct avec l'os. Alors que le polymère seul est entouré d'une membrane de tissu fibreux<sup>108</sup>.

Après 5 à 6 ans d'implantation dans le condyle fémoral de lapins, le composite PLLA/HA est complètement résorbé et remplacé par de l'os, alors que le polymère seul montre de faibles signes de conduction osseuse<sup>77</sup>. Cependant cette fonction d'ostéoconduction est

dépendante du site d'implantation. Pour être remplacé par de l'os, le composite doit être en contact avec l'os spongieux. En effet, le composite implanté dans la cavité médullaire n'a pas été remplacé par de l'os.

Seul Prokop *et al.*<sup>49</sup> n'observent pas de différence significative d'ostéointégration entre le polymère P(L,DL)LA et le composite chargé à 10% en  $\beta$ -TCP. Ceci est probablement lié au fait que le taux de charges est trop faible pour favoriser la repousse osseuse de façon significative.

- **Evolution de la dégradation *in vivo***

Effet de l'ajout de charges sur la vitesse de résorption *in vivo*

Concernant l'effet de l'ajout de charges sur la vitesse de résorption du matériau, les résultats sont assez différents d'une étude à l'autre. Cependant il est difficile de comparer les études car les modèles animaux et les matériaux testés sont différents d'une étude à l'autre.

La majorité des études montrent que le composite se dégrade plus rapidement que le polymère. Aunoble *et al.*<sup>75</sup> ont montré que le composite PLLA/ $\beta$ -TCP (60%) présentait une vitesse de dégradation plus importante que le polymère seul. Après 6 mois d'implantation dans le fémur de lapins, le PLLA n'apparaît pas dégradé. Alors que dès 3 mois des signes de dégradation apparaissent sur le composite. Et après 6 mois, celui-ci apparaît érodé et quelques implants sont fracturés.

Certains auteurs ont montré au contraire que le polymère se dégrade plus rapidement que le composite. Ainsi Prokop *et al.*<sup>49</sup> ont montré que le P(L,DL)LA se dégradait plus rapidement que le composite chargé en  $\beta$ -TCP (10%) dans le condyle fémoral de moutons. En effet après 18 mois d'implantation, les implants en polymère sont presque totalement dégradés alors que les implants en composite présentent simplement des fissures et une ostéolyse en surface. A 36 mois, les implants en polymère et composite sont tous totalement dégradés et remplacés par du tissu osseux. Une explication a été avancée pour interpréter cette différence de vitesse de dégradation entre le polymère et le composite. En effet la masse moléculaire du polymère (160,000 Da) est beaucoup plus faible que celle du composite (210,000 Da), ce qui explique que sa dégradation soit plus rapide. Il nous paraît cependant assez étonnant que la masse moléculaire augmente avec l'ajout de charges.

Corrélation entre la dégradation *in vitro* et la dégradation *in vivo*

Deux études ont comparé les vitesses de dégradation du même matériau *in vitro* et *in vivo*, mais ils observent des résultats différents.

Tuomo *et al.*<sup>45</sup> ont implanté un composite poly(L/DL)lactide 70:30 chargé à 20% en bioverre 13-93 en sous-cutané chez le rat. Ils ont observé que la perte de la résistance en flexion est plus rapide *in vivo* qu'*in vitro*. Après 24 semaines, la résistance en flexion a chuté de 70% *in vivo* et de 49% *in vitro*. La masse moléculaire en poids du composite chute immédiatement après implantation ou immersion dans un fluide biologique. Elle est réduite de 50% *in vivo* et de 41% *in vitro*.

A l'inverse, Verheyen *et al.*<sup>74</sup> ont observé que la dégradation du composite PLLA/HA (30%) est plus rapide *in vitro* qu'*in vivo* en sous-cutané dans la chèvre. Tant d'un point de vue de la perte de masse moléculaire viscosimétrique que de la chute de la résistance en flexion. La physiologie de la chèvre étant différente de celle du rat, il est difficile de comparer les deux études.

La fonctionnalité de ces matériaux composites comme dispositifs de consolidation osseuse a été testée par de nombreux auteurs. Les études tendent à montrer que ces matériaux sont aussi performants que les matériaux existants et apportent une composante 'bioactive' favorisant l'attache osseuse. Hojo *et al.*<sup>109</sup> ont testé la fonctionnalité d'une cage en PLLA chargée en HA chez la brebis. Les résultats ont montré que la qualité de la fusion obtenue avec ce composite était équivalente à celle obtenue par greffe autologue ou par une cage autorenforcée en fibres de carbone (CFC). De plus l'analyse histologique a montré une biocompatibilité supérieure de la cage composite par rapport à la cage en CFC.

Aucune étude n'a été réalisée *in vivo* sur le même composite que celui que nous allons développer. Mais les études portant sur le même copolymère<sup>45, 49</sup> ont montré une bonne biocompatibilité de ce matériau. Aucun signe d'inflammation notable n'a été observé. Et les études réalisées sur des composites chargés en bioverre<sup>45</sup>, montrent une bonne capacité d'ostéoconduction de ces biocéramiques.

#### **A.IV. CONCLUSION**

On comprend désormais l'intérêt grandissant de la recherche pour ces matériaux composites, et les avantages qu'ils peuvent apporter par rapport aux matériaux déjà existants. L'association d'une phase minérale à la matrice polymère, apporte le caractère « bioactif » tant convoité pour la repousse osseuse. Les propriétés mécaniques de la matrice polymère évitent le phénomène de stress-shielding souvent observé avec les implants métalliques. Enfin l'utilisation d'une matrice polymère permet de bénéficier des techniques de mise en forme de la plasturgie et d'un caractère résorbable.

Notre choix s'est porté sur le composite en copolymère P(L,DL)LA chargé en particules de bioverre 45S5. Ce copolymère a été choisi pour sa nature amorphe et son temps de dégradation plus adapté aux applications visées. Le choix de la phase minérale s'est porté sur le bioverre 45S5 qui est connu pour être le verre le plus bioactif.

Le polyacide lactique et le verre bioactif sont des matériaux déjà bien connus et étudiés depuis des années. Le polyacide lactique est déjà utilisé comme vis d'interférence et implant d'ostéosynthèse. Le verre bioactif quant à lui est déjà utilisé seul, en granules ou sous forme massive, pour le comblement osseux. Mais les études faites sur les composites denses polyacide lactique/verre bioactif sont encore peu nombreuses et les tendances observées dans la littérature sont souvent contradictoires.

L'objectif de cette thèse est de caractériser ce matériau composite P(L,DL)LA/Bioverre 45S5 avec différents taux de charges (20, 30, 50% en masse). Les inconvénients des différentes voies d'élaboration du matériau composite ont été soulevés. On a pu notamment constater que la sensibilité du polyacide lactique rend d'autant plus difficile sa mise en œuvre. Enfin l'attribution du rôle des charges sur les propriétés finales du composite n'est pas encore bien définie.

La première partie du manuscrit consiste donc à caractériser ce matériau d'un point de vue mécanique et physicochimique. Une analyse plus poussée des différentes étapes

d'élaboration et de leurs effets sur les propriétés finales du matériau sera menée. Des perspectives d'amélioration seront alors envisagées.

La seconde partie du manuscrit consiste à établir un scénario de cristallisation de l'hydroxyapatite à la surface des différents composites. L'effet du taux de charges sur la capacité bioactive du composite et sur la cinétique de cristallisation de l'hydroxyapatite sera recherché.

Très peu d'études de biocompatibilité ont été menées sur des matériaux composites similaires, mais les résultats montrent une très bonne biocompatibilité de ces matériaux. Une étude de biocompatibilité *in vitro* sera un préalable pour vérifier la viabilité des cellules ostéoblastiques en contact avec ce matériau. Enfin une implantation du matériau chez le lapin en intramusculaire et en intraosseux permettra de valider sa biocompatibilité *in vivo*. Elle permettra également d'évaluer la vitesse et l'importance de la repousse osseuse à la surface du composite et d'avoir une idée de la résorption de ce matériau *in vivo*.

## Références

1. Lefebvre L. Développement de bioverres poreux pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire [en ligne]. Thèse Génie des matériaux. Lyon : INSA de Lyon, 2007, 183 p. Disponible sur : <<http://docinsa.insa-lyon.fr/these/2007/lefebvre/these.pdf>> (consulté le 22.12.10).
2. Peroglio M. Composites organiques-inorganiques poreux pour la substitution osseuse [en ligne]. Thèse Génie des Matériaux. Lyon : INSA de Lyon, 2008, 167 p. Disponible sur : <[http://docinsa.insa-lyon.fr/these/pont.php?id=peroglio\\_martynovitch](http://docinsa.insa-lyon.fr/these/pont.php?id=peroglio_martynovitch)> (consulté le 22.12.10).
3. Legifrance. Code de la santé publique [en ligne]. Disponible sur: <<http://www.legifrance.gouv.fr>> (consulté le 28.05.2010). Available at: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690281&dateTexte=&categorieLien=cid>.
4. Snitem. L'industrie des Dispositifs Médicaux en 2008 [en ligne]. Disponible sur: <<http://www.snitem.fr/chiffres-cles/industrie-technologies-medicales.php>> (consulté le 04.08.2010).
5. Cabrol C. *Anatomie 1. Appareil locomoteur. Flammarion. Paris: 1995, 417 p.*
6. Gibson L, Ashby M, eds. *Cellular solids - Structure and properties. Second Edition, cambridge University: DR Clarke, S. Suresh, IM. wards FRS, 2001, p.431.*
7. Cowin S. *Bone Mechanics Handbook. CRC Press, Boca raton, 2001.*
8. Lacroix D. Biomechanical aspects of bone repair. In: Planell JA, ed. *Bone repair biomaterials*. Vol. 4. Cambridge: Woodhead publishing limited; 2009, 106-117.
9. Black J, Hastings G. *Handbook of Biomaterial Properties*. London: Chapman & Hall; 1998.
10. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philosophical transactions of the royal society* 2004, 362:2821-2850.
11. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 1996, 17:175-185.
12. De Santis R, Guarino V, Ambrosio L. Composite biomaterials for bone repair. In: Planell A, ed. *Bone repair biomaterials*. Vol. 9: Woodhead publishing in materials; 2009.
13. Cognet JM, Altman M, Simon P. Matériel d'ostéosynthèse: vis et plaques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). *Techniques chirurgicales-Orthopédie-Traumatologie* 2008, 44-015-A.
14. Biotech. Système d'ostéosynthèse - chirurgie avant pied [en ligne]. Disponible sur: <<http://www.biotech-ortho.com/osteosynthese-chirurgie-avant-pied.asp>>. (consulté le 16.07.2010).
15. Biotech. Ostéotomie - vis et plaques à verrouillage angulé [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.biotech-ortho.com/osteotomie-arthrodese-tibiale-elix-plate.asp>>. (consulté le 16.07.2010).
16. Rhumatologie SFd. Le rhumatologue est un médecin spécialiste [en ligne] .Disponible sur : <[http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/qu-est-ce-que-la-rhumato/07\\_douleur\\_articulation.asp](http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/qu-est-ce-que-la-rhumato/07_douleur_articulation.asp)> (consulté le 29.07.2010).
17. Likibi F. Intégration osseuse du TiNi poreux pour une arthrodèse intervertébrale. Thèse de médecine. Montréal. *Institut de génie biomédical Faculté de médecine* 2003, 306 p. Vol. PhD, Page 306.
18. Synthes. France - Chirurgie du rachis [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.synthes.com/html/Chirurgie-du-rachis.7883.0.html#c25745>> (consulté le 05.08.2010).
19. Klezl Z, Bagley C, Bookland M, Wolinsky J, Rezek Z, Gokaslan Z. Harms titanium mesh cage fracture. *European Spine Journal* 2007, 16:306-310.

20. SBM. Produits : DUOCAGE [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.s-b-m.fr/fr/produits/DUOCAGE.asp>> (consulté le 01.12.10).
21. Siddiqui A, Jackowski A. Cage versus tricortical graft for cervical interbody fusion. A prospective randomised study. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 2003, 85:1019-1025.
22. Implanet. Ancre de réinsertion des tissus [en ligne] .Disponible sur : <<http://www.implanet.com/>> (consulté le 04.08.2010). 2007.
23. Anatomie [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.genou.com/rotule/anatomie.htm>> (consulté le 29.11.10).
24. Anatomie descriptive : Myologie : Les muscles de la cuisse [en ligne]. Disponible sur : <[http://easy-look.fr/anatomie\\_descriptive/muscle\\_cuisse.php](http://easy-look.fr/anatomie_descriptive/muscle_cuisse.php)> (consulté le 01.12.10).
25. AIX-ORTHO. La ligamentoplastie du ligament croisé antérieur (LCA) du genou [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.aix-ortho.fr/ligamentcroisean.html>> (consulté le 01.12.10).
26. Stryker. Vis ACL Biosteon [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.france.stryker.com>> (consulté le 01.12.10). 2010.
27. Stryker. Technologie des implants résorbables [en ligne]. Disponible sur : <[http://www.stryker.fr/broc\\_delta\\_systeme-2.pdf](http://www.stryker.fr/broc_delta_systeme-2.pdf)>. (consulté le 16.07.2010).
28. Zitter H, Plenk HJ. The electrochemical behavior of metallic implant materials as an indicator of their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research* 1987, 21:881-896.
29. Layrolle P. Ostéointégration d'implants orthopédiques et dentaires. *Matériaux & Techniques* 2006, 94:71-76.
30. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström JOA. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 1969, 3:81-100.
31. Pfeiffer KM, Brennwald J, Büchler U, Hanel D, Jupiter J, Lowka K, Mark J, Staehlin P. Implants of pure titanium for internal fixation of the peripheral skeleton. *Injury* 1994, 25:87-89.
32. Gonzales-Carrasco JL. Metals as bone repair materials. In: *Bone repair biomaterials*. Vol. 6: Woodhead publishing in materials; 2009, 154.
33. Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 1998, 20:92-102.
34. Duparc J. *Conférences d'enseignement*. . Vol. 87. Paris: Elsevier; 2005.
35. Peltoniemi H, Ashammakhi N, Kontio R, Waris T, Salo A, Lindqvist C, Grätz K, Suuronen R. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2002, 94:5-14.
36. Schmitt E.
37. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2005, 32:762-798.
38. Ikada Y, Tsuji, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications* 2000, 21:117-132.
39. Maurus PB, Kaeding CC. Bioabsorbable implant material review. *Operative Techniques in Sports Medicine* 2004, 12:158-160.
40. Middleton JCM, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000, 21:2335-2346.
41. Stoclet G. Etude de la structuration à différents niveaux d'échelle et du comportement thermomécanique d'un polymère issu de ressources renouvelables : l'acide Poly(lactique). *Ecole Doctorale Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement* 2009. Vol. pHD, Page 315.
42. Scott G. *Degradable Polymers. Principles and Applications*: Kluwer Academic Publishers; 2002.



43. Suuronen R, Pohjonen T, Hietanen J, Lindqvist C. A 5-year in vitro and in vivo study of the biodegradation of polylactide plates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998, 56:604-614.
44. Hideto T. Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromolecular Bioscience* 2005, 5:569-597.
45. Tuomo P, Matti L, Hannu P, Pentti R, Henna N, Pertti T. Fixation of distal femoral osteotomies with self-reinforced poly(L/DL)lactide 70 : 30/bioactive glass composite rods. An experimental study on rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2004, 15:275-281.
46. Therin M, Christel P, Li S, Garreau H, Vert M. In vivo degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids): validation of in vitro findings. *Biomaterials* 1992, 13:pp.594-600.
47. Mainil-Varlet P, Rahn B, Gogolewski S. Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides : 1. One-year results. *Biomaterials* 1997, 18:257-266.
48. Bergsma JE, De Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, 16:25-31.
49. Prokop A, Höfl A, Hellmich M, Jubel A, Andermahr J, Rehm KE, Hahn U. Degradation of poly-L/DL-lactide versus TCP composite pins: A three-year animal study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005, Volume 75B 304 - 310.
50. Auras R, Harte B, Selke S. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience* 2004, 4:835-864.
51. Manson JA, Sperling LH. *Polymer blends and composites*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1976.
52. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 1999, 48:342-353.
53. Li S, McCarthy S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (-lactide). *Biomaterials* 1999, 20:35-44.
54. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995, 16:305-311.
55. Vert M, Li S, Garreau H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. *Clinical Materials* 1992, 10:3-8.
56. Saha SK, Tsuji H. Effects of molecular weight and small amounts of d-lactide units on hydrolytic degradation of poly(l-lactic acid)s. *Polymer Degradation and Stability* 2006, 91:1665-1673.
57. Jung JH, Ree M, Kim H. Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters. *Catalysis Today* 2006, 115:283-287.
58. Schwach G, Vert M. In vitro and in vivo degradation of lactic acid-based interference screws used in cruciate ligament reconstruction. *International Journal of Biological Macromolecules* 1999, 25:283-291.
59. Claes LE, Ignatius AA, Rehm KE, Scholz C. New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: Design, mechanical properties and in vitro degradation. *Biomaterials* 1996, 17:1621-1626.
60. Gupta AP, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique. *European Polymer Journal* 2007, 43:4053-4074.
61. Beaufils P, de Billy B, Cadilhac C, Djian P, Fenoll B, Giquel P, Journeau P, Mainard L, Prové S, Robert H, et al. Une pathologie de l'adolescent sportif L'ostéochondrite disséquante du genou. *Congrès de la SOFCOT* 2005. Vol. 7837.
62. Hench L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1998, 81:1705-1728.
63. Vallet-regi M, Salinas AJ. Ceramics as bone repair materials. In: Planell A, ed. *Bone repair biomaterials*: Woodhead publishing in materials; 2009, 194.
64. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003, 24:2161-2175.

65. Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006, 17:967-978.
66. Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Barrias CC, Barbosa MA. In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:411-419.
67. Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Närhi T, Jokinen M, Seppälä J, Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* 2004, 25:575-581.
68. Niemelä T, Niiranen H, Kellomäki M, Törmälä P. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I: Initial mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:235-242.
69. Wang M, Joseph R, Bonfield W. Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* 1998, 19:2357-2366.
70. Bonner M, Saunders LS, Ward IM, Davies GW, Wang M, Tanner KE, Bonfield W. Anisotropic mechanical properties of oriented HAPEX™. *Journal of Materials Science* 2002, 37:325-334.
71. Bonfield W, Wang M, Tanner KE. Interfaces in analogue biomaterials. *Acta Materialia* 1998, 46:2509-2518.
72. Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials* 1999, 20:859-877.
73. Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. A 5-7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials* 2006, 27:1327-1332.
74. Verheyen CCPM, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behavior. *Journal of Biomedical Materials Research* 1992, 26:1277-1296.
75. Aunoble S, Clément D, Frayssinet P, Harmand MF, Le Huec JC. Biological performance of a new  $\beta$ -TCP/PLLA composite material for applications in spine surgery: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2006, 78:416-422.
76. Bleach NC, Nazhat SN, Tanner KE, Kellomäki M, Törmälä P. Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate--polylactide composites. *Biomaterials* 2002, 23:1579-1585.
77. Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). *Biomaterials* 2005, 26:5542-5551.
78. Gay S, Arostegui S, Lemaitre J. Preparation and characterization of dense nanohydroxyapatite/PLLA composites. *Materials Science and Engineering: C* 2009, 29:172-177.
79. Niemelä T. Effect of  $\beta$ -tricalcium phosphate addition on the in vitro degradation of self-reinforced poly-L,D-lactide. *Polymer Degradation and Stability* 2005, 89:492-500.
80. Ishii S, Tamura J., Furukawa, T., Nakamura, T., Matsusue, Y., Shikinami, Y., Okuno, M. Long-term study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures: A 2-4-year follow-up study in rabbits. *Macromolecular Rapid Communications* 2003, 21:117-132.
81. Blaker JJ, Bismarck A, Boccaccini AR, Young AM, Nazhat SN. Premature degradation of poly( $\alpha$ -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites. *Acta Biomaterialia* 2009, 6:756-762.
82. Pyhältö T, Lapinsuo M, Päätiälä H, Pelto M, Törmälä P, Rokkanen P. Fixation of distal femoral osteotomies with self-reinforced polymer/bioactive glass rods: an experimental study on rabbits. *Biomaterials* 2005, 26:645-654.

83. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Närhi T, Yli-Urpo A, Seppälä J. In vitro evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2002, 23:2143-2150.
84. Zhou Z-h, Ruan J-m, Zhou Z-c, Shen X-j. Bioactivity of bioresorbable composite based on bioactive glass and poly-L-lactide. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2007, 17:394-399.
85. Wilda H, Gough JE. In vitro studies of annulus fibrosus disc cell attachment, differentiation and matrix production on PDLLA/45S5 Bioglass® composite films. *Biomaterials* 2006, 27:5220-5229.
86. Lu HH, Tang A, Oh SC, Spalazzi JP, Dionisio K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 2005, 26:6323-6334.
87. Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E. Poly(D,L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 2000, 21:2147-2154.
88. Paiva AO, Duarte MG, Fernandes MHV, Gil MH, Costa NG. In vitro studies of bioactive glass/polyhydroxybutyrate composites. *Materials Research* 2006, 9:417-423.
89. Ara M, Watanabe M, Imai Y. Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials* 2002, 23:2479-2483.
90. Kasuga T, Ota Y, Nogami M, Abe Y. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials* 2001, 22:19-23.
91. Russias J, Saiz E, Nalla RK, Gryn K, Ritchie RO, Tomsia AP. Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation. *Materials Science and Engineering: C* 2006, 26:1289-1295.
92. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003, 24:2133-2151.
93. Peurton F. Nanocomposites à matrice thermoplastique et renforts plaquettaires : relations élaboration-structure-propriétés. *Génie des matériaux* 2008. Vol. PhD.
94. Mitchell NB. The indirect tension test for concrete. *Bulletin, American Society for Testing Materials* 1961. Vol. 1, Pages 780-788.
95. Todo M, Park SD, Arakawa K, Takenoshita Y. Relationship between microstructure and fracture behavior of bioabsorbable HA/PLLA composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 2006, 37:2221-2225.
96. ISO. Implants for surgery - in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. ISO 23317 2007, 13 p.
97. Li H, Chang J. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. *Composites Science and Technology* 2005, 65:2226-2232.
98. Boccaccini AR, Maquet V. Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology* 2003, 63:2417-2429.
99. Qiu H, Yang J, Kodali P, Koh J, Ameer GA. A citric acid-based hydroxyapatite composite for orthopedic implants. *Biomaterials* 2006, 27:5845-5854.
100. Blaker JJ, Gough JE, Maquet V, Notingher I, Boccaccini AR. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2003, 67:1401-1411.
101. Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials* 2004, 25:3013-3021.
102. Helen W, Gough JE. Cell viability, proliferation and extracellular matrix production of human annulus fibrosus cells cultured within PDLLA/Bioglass® composite foam scaffolds in vitro. *Acta Biomaterialia* 2008, 4:230-243.
103. Helen W, Merry CLR, Blaker JJ, Gough JE. Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA/Bioglass® composite foam scaffolds: Assessment of cell

- attachment, proliferation and extracellular matrix production. *Biomaterials* 2007, 28:2010-2020.
104. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass® composite films in the absence of osteogenic supplements. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2007, 80:837-851.
  105. Zhou Z-h, Ruan J-m, Zou J-p, Zhou Z-c, Chen L-l. Preparation of poly-L-lactide/bioactive glass composite and evaluation of cytotoxicity in vitro. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2008, 18:1151-1156.
  106. Yang XB, Webb D, Blaker J, Boccaccini AR, Maquet V, Cooper C, Oreffo ROC. Evaluation of human bone marrow stromal cell growth on biodegradable polymer/Bioglass® composites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 342:1098-1107.
  107. Yasunaga T, Matsusue Y, Furukawa T, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles/poly(L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999, 47:412-419.
  108. Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T, Nakagawa Y, Okada Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, 50:410-419.
  109. Hojo Y, Kotani Y, Ito M, Abumi K, Kadosawa T, Shikinami Y, Minami A. A biomechanical and histological evaluation of a bioresorbable lumbar interbody fusion cage. *Biomaterials* 2005, 26:2643-2651.

## Chapter B

### B. ARTICLE 1

# Mechanical characterization of a PDLLA/Bioglass® composite, influence of process on properties

<b>B.I. Introduction</b>	<b>71</b>
<b>B.II. Materials and methods</b>	<b>72</b>
B.II.1 Materials	72
B.II.2 Two different routes for polymer and composite processing	73
B.II.3 Microstructural and morphological characterization	75
B.II.4 Mechanical characterization	77
<b>B.III. Results</b>	<b>78</b>
B.III.1 Properties of polymer and composite elaborated by injection moulding	78
B.III.2 Improvement of the composite properties with the second elaboration route	84
B.III.3 Microstructure of both injected and pressed materials	85
<b>B.IV. Conclusion</b>	<b>91</b>

*Cet article décrit le mode d'élaboration et de mise en forme du composite : dans un premier temps l'élaboration des granules par voie solvant, puis la mise en forme par injection. L'objectif de cette étude est de dresser une caractérisation complète du matériau composite mis en forme par injection, qui est le mode d'élaboration utilisé par la société Noraker pour produire des vis d'interférence en composite. Nous avons noté une forte influence du procédé d'élaboration sur les propriétés finales de la matrice polymère. Un retour sur l'élaboration s'est donc avéré nécessaire. L'objectif de ce travail a donc été de mieux comprendre l'impact du mode d'élaboration sur les propriétés finales de la matrice. Mieux contrôler les propriétés de la matrice permettrait en effet d'adapter ces dernières en fonction du cahier des charges des applications recherchées.*

## ABSTRACT

We investigate the effect of the process and filler addition on the mechanical properties of a poly(L,DL)lactide with a 70L/30DL ratio reinforced with 45S5 Bioglass® particles (30% in weight, i.e. 17% in volume). Polymer and composite granules are elaborated by a solvent route method and then processed by injection moulding to prepare samples for characterization. Microstructural, morphological and mechanical properties of the materials are investigated. Mechanical characterization reveals a decrease of the mechanical strength with the addition of Bioglass®. Reduction of the yield tensile stress can be explained by a low interface between polymer and Bioglass®. However, the addition of the Bioglass® particles cannot explain alone the decrease of Vickers hardness and yield compressive stress of the composite as compared to neat polymer. This reduction in mechanical properties is therefore mainly attributed to a modification of the polymer matrix properties. Indeed an important molecular weight decrease (Mw) is observed by size exclusion chromatography for the composite, after both granules elaboration and injection moulding. Several parameters can catalyze polymer matrix degradation during these two steps. Bioglass® can release alkaline ions during granules elaboration thus catalyzing polymer matrix hydrolysis. During injection, elevated temperature and shear stresses induce also the polymer matrix degradation. Molecular weight of the injected composite being close to the entanglement molecular weight, it can be traduced by a rapid lost of mechanical properties *in vivo*. In order to better control the polymer matrix properties, and in particular to obtain composite with higher molecular weight, another processing route has been carried out. Polymer and composite samples were elaborated by solvent casting followed by hot pressing at lower temperature than for injection moulding. The molecular weight and the mechanical properties of the composite obtained by this second elaboration route are considerably increased as compared to the injection method. In order to better understand mechanisms occurring during elaboration, a study of the microstructure of both injected and pressed materials is carried out. X-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared (FTIR) and Dynamic mechanical analysis (DMA) are performed on all these materials. FTIR spectroscopy shows the apparition of a peak at  $1600\text{ cm}^{-1}$  with addition of Bioglass® particles with both routes. This peak is attributed to the formation of a new ester function due to the interactions between the polymer chains and the Bioglass® particles. DMA results reveal a shift of  $\alpha$  relaxation to the higher temperatures for the injected polymer. This behavior can be attributed to the cristallinity of the injected polymer as confirmed by XRD. Moreover, the cristallinity of the injected polymer matrix can also explain the higher storage modulus of the injected polymer compare with the pressed one. This study shows the importance of the elaboration process on the physical and mechanical properties of the final composite, and in particular the effect of the Bioglass® particles on a resorbable polymer matrix.

## B.I. INTRODUCTION

Biomaterials used in most orthopaedic implants today have an elastic modulus at least one order of magnitude higher (metallic implants) or lower (polymeric implants) than that of the natural bone tissue. Materials being stiffer than bone tissue, like metallic implants, can lead to stress shielding of the surrounding tissue and promoting osteolysis<sup>1,2</sup>. It results in the resorption of the surrounding tissues and micro-motions of the implant, requiring in the worst cases revision surgery. Furthermore, though these materials are biocompatible, they cannot self-repair like natural bone and cannot be resorbed. Since the early 1980s, hydroxyapatite (HA) reinforced high density polyethylene (HDPE) composites (HAPEX™) have been extensively developed as an alternative for bone replacement<sup>3</sup>. Despite their more suitable mechanical and biological properties compared to metal implants, these materials are not resorbable. To improve the integration in the body, a new generation of organic-inorganic composites have been developed. To date these bioactive and biodegradable composites include poly(lactic acid)/hydroxyapatite (HA/PLLA)<sup>4-6</sup>, poly(lactic acid)/  $\beta$ -tricalcium phosphate (PLLA/ $\beta$ -TCP)<sup>7</sup> and other copolymers of lactic acid or polycaprolactone with bioactive ceramics<sup>8-10</sup>. More recently some workers have filled polymer matrix with bioactive glasses especially the 45S5 Bioglass®<sup>9-12</sup>. This Bioglass is known to be the most bioactive and it seems to exhibit the particularity to be osteoconductive and osteoinductive<sup>13</sup>.

Bioactive composites are commonly produced by two-steps processes. In a preliminary step the components are mixed to obtain granules. The injection or compression moulding<sup>7,9,10</sup> of these granules enables manufacturing composites with tailored shapes. They can also be produced by solvent casting process followed by a hot pressing step<sup>14</sup>. This last method does not allow the production of implants with complex shape, but the simplicity of the process is interesting, at least from an academic point of view.

Implants made of PLLA may take several years to fully degrade, with possible clinical complications (inflammation) due to foreign body (crystalline fragments of PLLA released during degradation<sup>15</sup>). Composites made of lactic acid copolymer P(L,DL)LA present the advantages to be amorphous. Consequently P(L,DL)LA has a resorption period more appropriate for bone healing, shorter than that of PLLA. The effect of the filler on the mechanical properties of the composite has been studied in different systems in the literature: polyethylene reinforced with HA<sup>16</sup>, polyetheretherketone reinforced with HA whisker<sup>17</sup> but also poly lactic acids reinforced with HA<sup>5,6</sup> or bioactive glass<sup>12</sup>. In general, addition of HA has no significant effect on the compressive strength except for higher content of HA (50 wt%)<sup>5,18</sup>. On the other hand, tensile strength seems to decrease for HA ratio as low as 20 wt%<sup>5,6</sup>. A bad interface between polymer matrix and HA particles is generally proposed to explain this reduction of tensile strength. Microstructure of the polymer matrix can also change the mechanical properties, but this parameter is not taken into account. For example, much less is known concerning the evolution of the matrix structure during elaboration.

Blaker et al.<sup>12</sup> have studied a composite P(DL)LA/45S5 Bioglass® with an amorphous matrix. They have observed an important reduction of the compressive properties of the PDLLA with addition of Bioglass® particles. It is correlated with an important decrease of the molecular weight of the matrix during processing at high temperature in presence of

Bioglass® particles. They suggested that this reaction:  $\text{RSiO}^- + \text{R}'\text{CO}_2\text{R}'' \rightarrow \text{RSiOR}'' + \text{R}'\text{CO}_2^-$  may occur between polymer and Bioglass® leading to the matrix degradation. Several phenomenon of degradation may occur during high temperature process of poly lactic acids. Reactions involved in the thermal degradation of lactic acid based polymers can be thermohydrolysis, zipper-like depolymerization, thermo-oxidative degradation and transesterification<sup>19-21</sup>.

In our study, we have decided to investigate the P(L,DL)LA/45S5 Bioglass® composite that associates the advantages of both components: bioresorbability of the matrix and bioactivity of the filler. Our objective is therefore to characterize the mechanical and structural properties of the injected P(L,DL)LA/Bioglass® composite, but also to understand the relations between process, microstructure and mechanical properties.

## B.II. MATERIALS AND METHODS

### B.II.1 Materials

Poly(L,DL)lactide granules with a 70L:30DL ratio (cf. Fig.1) and an inherent viscosity between 5.7 and 6.5 dl/g (in chloroform, 25°C) were supplied from Boehringer Ingelheim (Germany). 45S5 Bioglass® particles of chemical composition (in wt.%) 45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% CaO, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were used as the filler phase in the composite. The 45S5 Bioglass® particles presented an irregular shape and a mean size of 3-4 µm (cf. Fig. 2). Glass transition temperatures of both polymer and composite were estimated by differential scanning calorimetry to  $57.6 \pm 0.4$  and  $55.4 \pm 0.9$  respectively (DSC Pyris Diamond, Perkin Elmer).

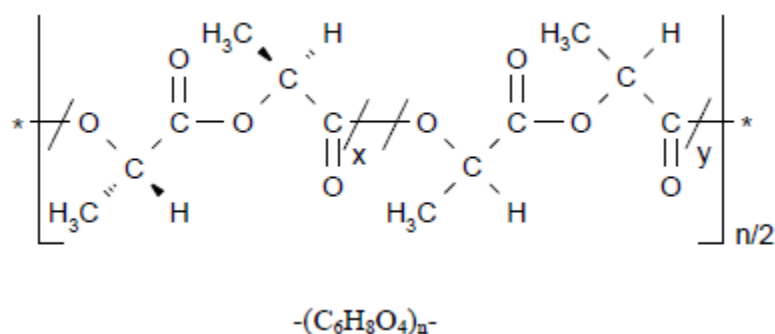


Figure 1 : Chemical formula of the P(L,DL)LA from Boehringer Ingelheim.



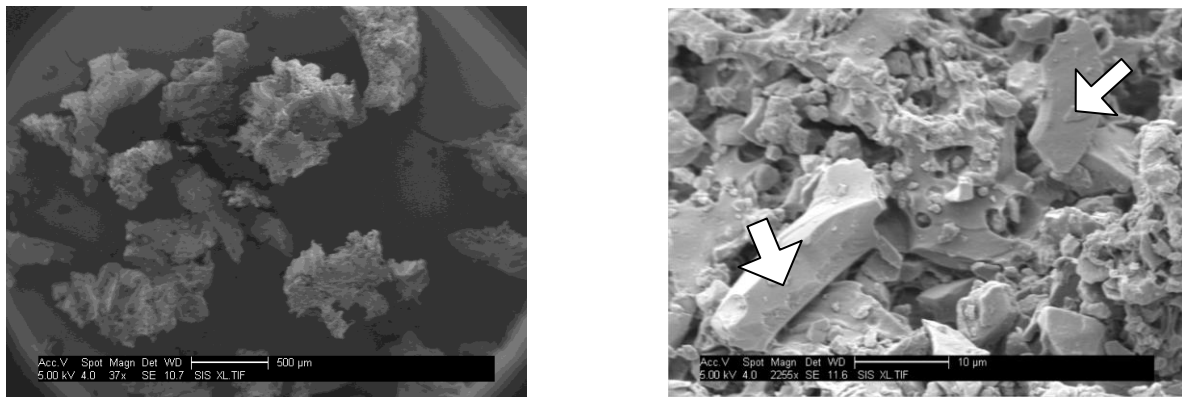


Figure 2: SEM observation of composite granules at 2 different magnifications. On the right, the arrows indicate Bioglass® particles.

### B.II.2 Two different routes for polymer and composite processing

#### a) Composite granules elaboration and injection moulding

Composite granules with 30 wt.% of Bioglass® particles were processed following a patented protocol (Patent WO2008116984 (A2))<sup>22</sup>. Briefly, Bioglass® particles are first put in suspension in a solvent, then polymer is added and mixed to reach the desired P(L,DL)LA/Bioglass® ratio. The homogenous mixture is then precipitated in water. The precipitate is milled and sieved to obtain granules with a mean diameter of 1-3 mm. Polymer granules or composite granules with 30 wt.% (17 vol.%) Bioglass® are then injection moulded into plates, cylinders and dumbbells specimens for mechanical testing. The pressure applied during injection moulding was around 150 bars. Validation of the process for medical devices realization was carried out by injection molding of screws (Fig. 3). X-Ray tomography of the composite screw was performed to control the dispersion of the Bioglass® particles and the absence of defects (see Figure(3)).



Figure 3: Photograph and computed X-tomography of the upper part of the P(L,DL)LA/Bioglass® 45S5 (30 wt.%) composite screw (ActiKER™, Noraker, France) processed by injection moulding.

b) Solvent casting method and hot pressing

Polymer and composite films were obtained using a solvent casting method. First, the P(L,DL)LA was dissolved in a solvent (6% w/v) for 24 h. Separately Bioglass® particles (30wt.%) were dispersed in a solvent (15% w/v) and sonicated for 10 min. Once the polymer solubilized, glass particles were introduced and mixed with the polymer solution until obtaining a homogeneous mixture. This mixture was then cast into a glass mold and dried for 48 h at room temperature to remove all traces of solvent. Films obtained were subsequently dried in a vacuum to eliminate water that could induce polymer hydrolysis. Polymer and composite films were then pressed using a uniaxial press. They were held at approximately 4 MPa during 2 minutes at high temperature, then cooled to room temperature and stored in a desiccator before test.

Material	Bioglass® particles	Processing route	Specimen shape
Polymer	0	Injection moulding	dumbbells plates, cylinders
Composite	30 wt.% (or 17 vol.%)		dumbbells plates, cylinders
Polymer	0	Hot pressing	parallelepipeds, dumbbells
Composite	30 wt.% (or 17 vol.%)		

Table 1: Summary of P(L,DL)LA and P(L,DL)LA/Bioglass® composites used in the study.

A summary of the two elaboration routes is presented in Figure 4. Polymer and composite elaborated by injection moulding will be called hereafter “injected polymer” and “injected composite” respectively; polymer and composite elaborated by hot pressing will be called “pressed polymer” and “pressed composite” respectively.

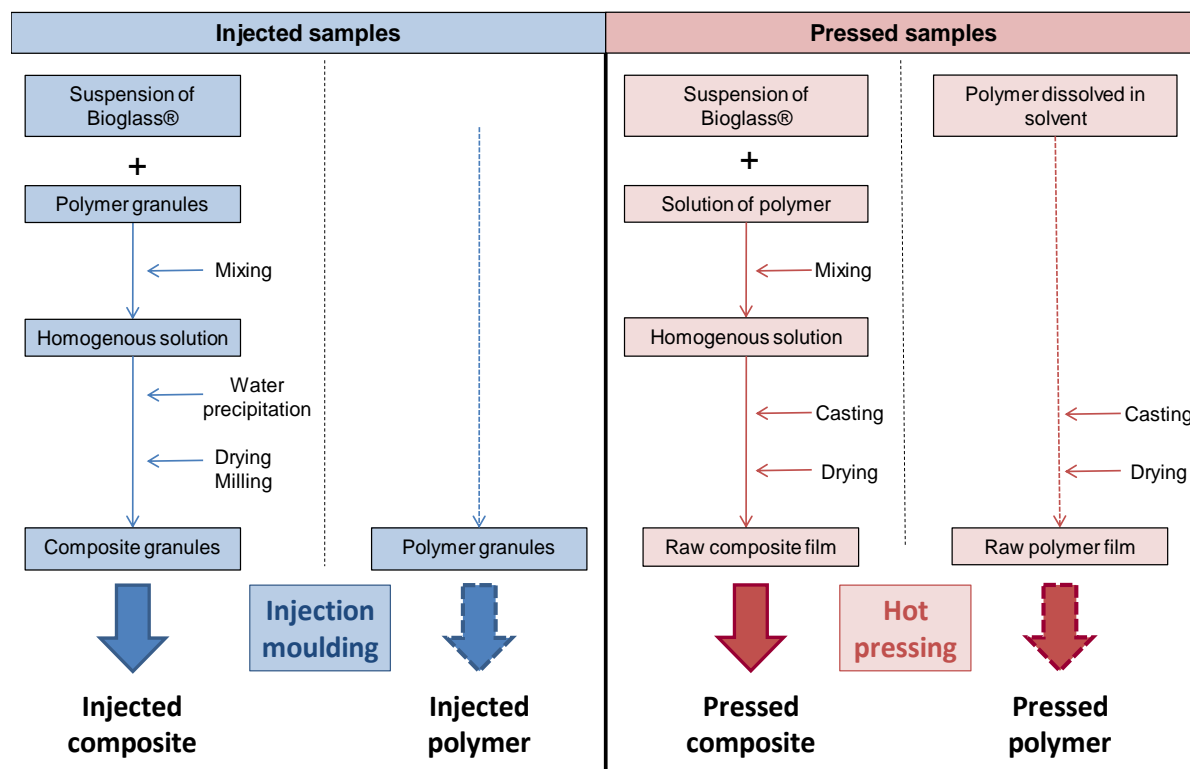


Figure 4: Summary of the two elaboration routes.

### B.II.3 Microstructural and morphological characterization

#### a) Computed Tomography

Computed tomography (V|tome|x, Phoenix|x-ray, Germany) was performed on the injected and pressed composite specimens in order to control the distribution of the filler in the matrix. Tomographies were conducted with a voxel resolution of 3.5  $\mu\text{m}$ . As the Bioglass® particle size is approximately 3  $\mu\text{m}$ , it was not possible to visualize each particle. The variation of local density in the material was used to characterize the repartition of Bioglass® particles.

#### b) Size Exclusion Chromatography (SEC)

Polymer molecular weight was determined by size exclusion chromatography (SEC) using a PLgel MIXED-C 5 $\mu\text{m}$  column (Polymer Laboratories) equipped with a light scattering detector (miniDAWN™ TREOS) with a  $dn/dc$  value of 0.2. Weight average molecular weight ( $M_w$ ) as well as number average molecular weight ( $M_n$ ) were measured at several elaboration stages of the injection and hot pressing processes. Before measurement, materials were dissolved in a solvent (10 mg/ml) and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) to remove Bioglass® particles. To summarize,  $M_w$  and  $M_n$  were measured on the polymer matrix of:

- (1) raw polymer granules;
- (2) composite granules after solvent route elaboration;
- (3) injected polymer and composite;
- (4) pressed polymer and composite.

As the index of polydispersity was constant we decided to present only the weight average molecular weight ( $M_w$ ). In the following section,  $M_w$  will be called 'molecular weight'.

#### c) X-Ray Diffraction (XRD)

---

X-ray diffraction was used to control the change of the microstructure of the polymer matrix after both injection moulding and hot pressing. The measurements were performed on a Bruker Advance D8 diffractometer, using  $\text{CuK}\alpha$  radiation in a  $\theta$ - $2\theta$  mode (starting and final  $2\theta$ : 8 and  $60^\circ$ , step size:  $0.05^\circ$ , time per step: 1.5s, operation parameters: 40kV and 40 mA).

#### d) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

---

Attenuated total reflectance (ATR)-FTIR was used to assess any chemical changes that may occur during both injection moulding and hot pressing but also with adding Bioglass® particles. Spectra were obtained at room temperature using Nicolet iS10 FTIR spectrometer equipped with a Diamond HATR (Thermo Scientific Instrument). The resolution was set at  $4\text{ cm}^{-1}$  and the wavenumber ranged between  $4000$  and  $400\text{ cm}^{-1}$ , with 32 scans per spectra.

#### B.II.4 Mechanical characterization

---

##### a) Elastic modulus by ultrasonic measurements

---

Elastic modulus was determined by ultrasonic wave propagation with a piezoelectric contact transducer (5 MHz). Tests were carried out on parallelepiped specimens (70 x 45 x 3 mm<sup>3</sup>). Elastic modulus was obtained from longitudinal and transversal velocities as shown in equation (1). The transmitted wave velocity was obtained from the phase lag between the neighboring echoes and the travel distance ( $v_i = d_i/\Delta t$ , where  $d_i$  is the specimen dimension in the direction of wave propagation and  $\Delta t$  is the time delay for wave transmission).

$$E = \rho \cdot v_T^2 \cdot \left( \frac{3 \cdot v_L^2 - 4 \cdot v_T^2}{v_L^2 - v_T^2} \right) \quad (1)$$

##### b) Tensile tests

---

Tensile tests were performed on a MTS universal testing machine at a strain rate of 1% per minute, in agreement with NF EN ISO 527-2. These tests were carried out on injected dumbbell specimens of polymer and composite ( $L$ : 35 mm, rectangular cross-section: 2 x 5 mm<sup>2</sup>). A video-extensometer was used to monitor the displacement within the specimen gauge length for an accurate measure of strain. Two parameters were obtained from the true stress-strain curve: elastic modulus ( $E_t$ ) and yield tensile stress ( $\sigma_t$ ). Strain to failure ( $\epsilon_f$  (%)) was obtained directly from the nominal stress-strain curve.

Tensile-fractured surfaces of injected polymer and composite were gold coated (20 nm) and examined using a scanning electron microscope (SEM, Philips XL20) with an accelerating voltage of 10kV.

##### c) Compressive tests

---

Compressive tests were performed on an INSTRON 8502 machine on polymer and composite injected cylinders ( $L$ : 11 mm,  $\varnothing$ : 6 mm), with a cross-head speed of 1 mm/min in accordance with NF EN ISO 604:2002. Two main parameters were obtained from the true stress-strain curve: yield compressive stress ( $\sigma_c$ ) and elastic modulus ( $E_c$ ).

#### d)Vickers hardness

---

Vickers hardness of polymer and composite obtained by injection moulding and hot pressing was measured on a TESTWELL FV700 machine. A 5N load was applied on the specimens during 10s. Vickers hardness  $H_V$  is calculated using the contact area of the indentation print, following equation (2).  $D$  is defined as the average of the two diagonals of the resultant square-shaped impression (mm) and  $F$  the applied force (N). This mechanical testing is well suited to check the change in the mechanical properties regardless of the thickness of the sample.

$$H_V = 1.854 \cdot \left( \frac{F}{D^2} \right) \quad (2)$$

#### e)Dynamic Mechanical Analysis

---

Dynamic mechanical analysis (DMA) was performed on the pressed and injected polymer and composite with a laboratory-made inverted torsion pendulum. Parallelepipedic specimens with dimensions  $8 \times 5 \times 0.5 \text{ mm}^3$  were tested after drying in high vacuum oven. DMA testing was performed at 1Hz and at a heating rate of  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  from  $-70$  to  $170^\circ\text{C}$ . The DMA results are presented with two main parameters: storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ).  $\alpha$  relaxation is defined as the temperature where the loss modulus reaches a peak value.

Injected samples were heated before testing, in order to remove any polymer chains orientation due to elaboration process (injection).

## B.III. RESULTS

---

### *B.III.1 Properties of polymer and composite elaborated by injection moulding*

#### a)Homogeneity of particles distribution

---

Tomography scans show a nearly homogeneous distribution of the Bioglass® particles within the P(L,DL)LA matrix (Fig. 5). The areas of high concentration of particles appear in white. These results, in addition to that presented on the screw, confirm that the injection process enables to obtain well-dispersed filler in the polymer matrix. The same results were observed for the composites elaborated by the “pressed samples” process.

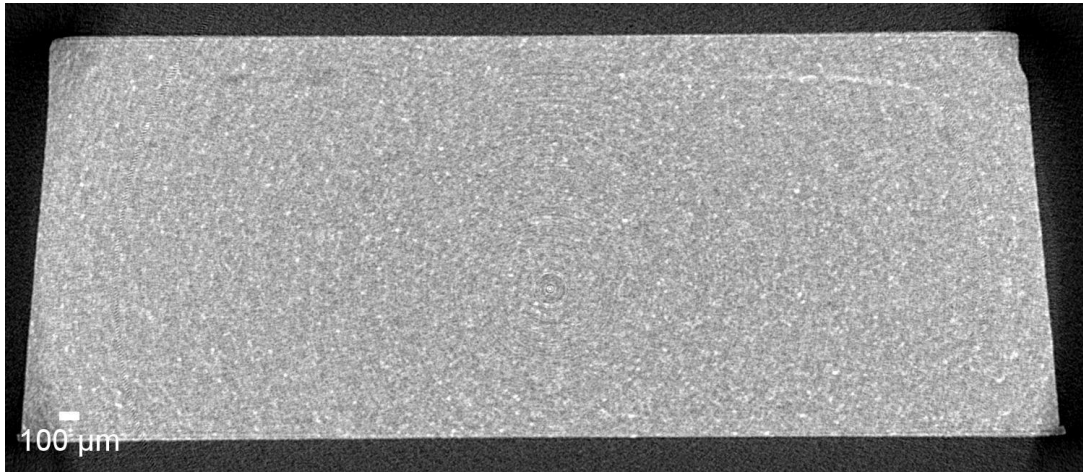


Figure 5: Tomography-X of P(L,DL)LA/Bioglass® 45S5 (30 wt.%) composite from injected dumbbell specimen.

## b) Mechanical properties

---

### Elastic modulus

The elastic modulus, measured during tensile and compressive tests or with ultrasonic propagation, increases with the addition of Bioglass® particles (Table 2). These results are consistent with the results of the literature regardless of the type of fillers<sup>5, 6, 18</sup>. The composite modulus is enhanced by adding hard particles to the matrix. Indeed, the elastic modulus of Bioglass® can be estimated at around 85 GPa<sup>23</sup> (even if lower values can be found in the literature<sup>24, 25</sup>). We confirmed this value of 85 GPa with a US measurement on a bulk Bioglass® sample ( $\varnothing$ : 16 mm;  $\Delta x$ : 2 or 0.76 mm). The elastic modulus obtained by ultrasonic wave propagation technique is higher than tensile and compressive ones for both polymer and composite samples. The explanation comes from the testing rate of the samples. Samples are submitted to higher testing rate during an ultrasonic test (5MHz) compared to a tensile test (~ 1Hz). According to the time-temperature equivalence principle, the PDLLA  $\alpha$  relaxation temperature is shifted according to the testing rate. At low test frequency, the PDLLA  $\alpha$  relaxation temperature is around 50°C, but the half width of the relaxation peak is around 30°C. Consequently, at room temperature, the sample is slightly softened because it is already in the drop zone of modulus between the glassy state and the rubbery plateau. At high frequency, the PDLLA  $\alpha$  relaxation temperature is well above 50°C and at room temperature the sample is in the glassy state, what explains its higher value of modulus. However the relative influence of Bioglass® particles on the modulus is similar whatever the characterization method.

	Tensile test			Compressive test		Ultrasonic measurement
	$\sigma_t$ (MPa)	$\epsilon_f$ (%)	$E_t$ (GPa)	$\sigma_c$ (MPa)	$E_c$ (GPa)	E (GPa)
Polymer	55 ± 6	7 ± 1.5	3.1 ± 0.3	95.4 ± 0.8	3.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2
Composite	31 ± 3	3 ± 0.6	4.9 ± 0.7	85.6 ± 1.6	3.9 ± 0.3	6.2 ± 0.2

Table 2: Mechanical properties of injected polymer and composite: yield tensile stress ( $\sigma_t$ ), tensile strain to failure ( $\epsilon_f$ ), tensile modulus ( $E_t$ ), yield compressive stress ( $\sigma_c$ ), compressive modulus ( $E_c$ ) and elastic modulus by ultrasonic measurement ( $E$ ). Standard deviation of each value is also presented.

**Mechanical strength**

The yield tensile stress of injected samples decreases with addition of Bioglass® particles (Fig. 6, Table 2). Figure 6 shows typical nominal tensile stress-strain curves of polymer and composite. The stress-strain curve of injected polymer samples exhibits plastic deformation. The stress-strain curve of injected composite samples is typical of a brittle sample, as it can also be seen on the photography of the specimen after break.

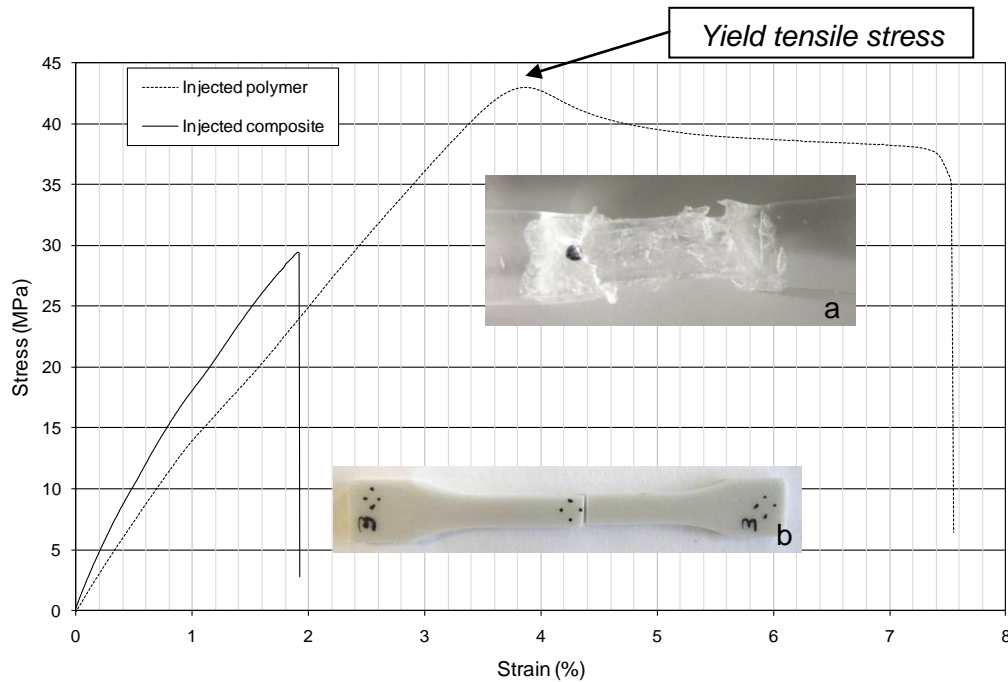


Figure 6: Nominal stress-strain curves in tensile tests of injected polymer (dotted line) and P(L,DL)LA+30wt.% Bioglass composite (full line) and photographs of (a) a polymer specimen during plastic strain and (b) a composite specimen after tensile failure.

SEM observation of the composite tensile-fractured surface revealed micro-voids around Bioglass® particles (Fig.7.b). These micro-voids certainly appear during loading, since they are not present on cryofractures (Fig.7a). This observation suggests that the interface between filler matrix might not be strong enough to transfer the stress from the matrix to the



filler during tensile test. This micro-voiding phenomenon may account for the brittle behavior of the composite in tension.

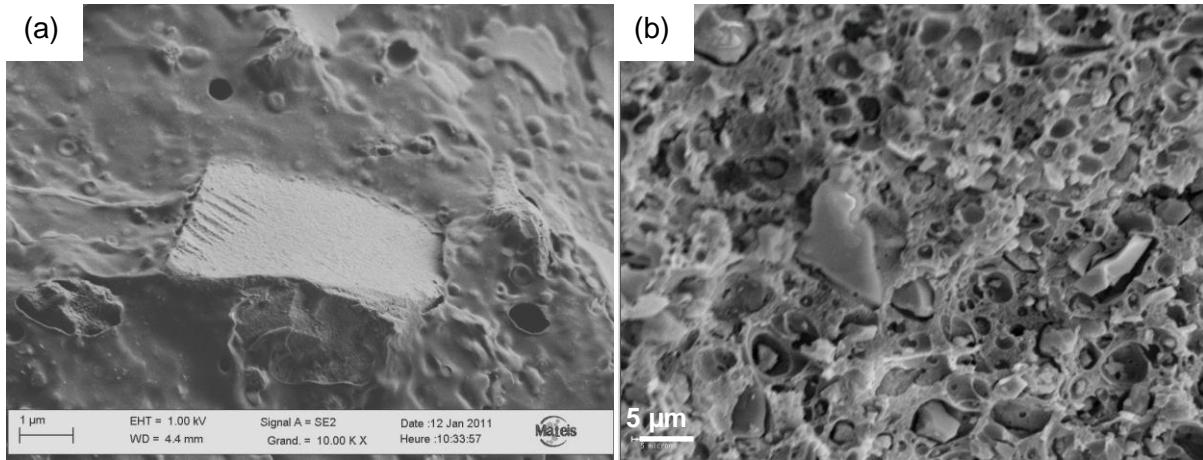


Figure 7:(a) SEM Cryofracture of an injected composite and (b) SEM of an injected composite after tensile test.

Figure 8 shows a typical nominal compressive stress-strain curve of polymer and composite. The yield compressive stress ( $\sigma_c$ ) decreases weakly with inclusion of Bioglass® particles, but the plateau stress after yielding shows a higher value than for the polymer. Presence of Bioglass® particles may hinder the yielding of the polymer chains at high strains.

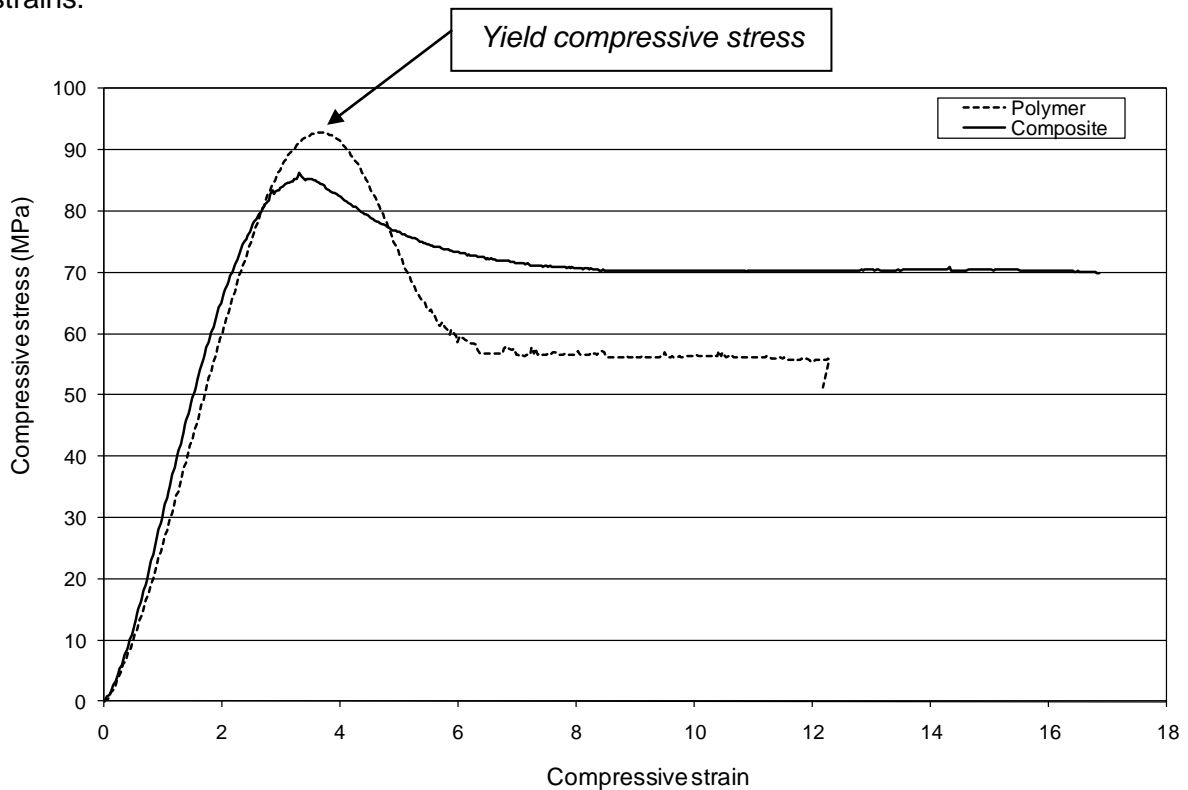


Figure 8: Nominal stress-strain curves in compressive tests of injected polymer (dotted line) and composite (full line).

Mechanical characterization showed an increase of the elastic modulus with addition of Bioglass® as expected. A decrease of tensile strength and strain to failure can be explained by a relative low interface between polymer and Bioglass® particles, as it was observed on the tensile-fracture surfaces. The lower yield compressive stress of the composite as compared to the neat polymer may also be associated to a degradation of the polymer matrix, as possibly expected from the literature survey<sup>12</sup>.

### c)Molecular weight changes

---

The decrease of some mechanical properties with addition of Bioglass® suggested a modification of the polymer matrix properties. An investigation of the molecular weight change during the different process steps (after granules elaboration and after injection moulding) was carried out.

#### Influence of the composite granules elaboration

The first reduction of molecular weight takes place during the composite granules elaboration. During this stage, polymer matrix lost around 35% of its Mw (from around 515 kg.mol<sup>-1</sup> for the raw polymer granules to 330 kg.mol<sup>-1</sup> for the composite granules) (Fig. 10). Mechanical mixing of the polymer in solvent in presence of Bioglass® particles, during several hours, may generate drastic conditions for the polymer matrix. Ions released by Bioglass® particles (SiO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SiO<sub>3</sub><sup>-</sup> ...) could catalyze the break of the ester linkage, as it happens with hydroxyl anions which catalyze the hydrolysis of polyesters (Fig. 9).

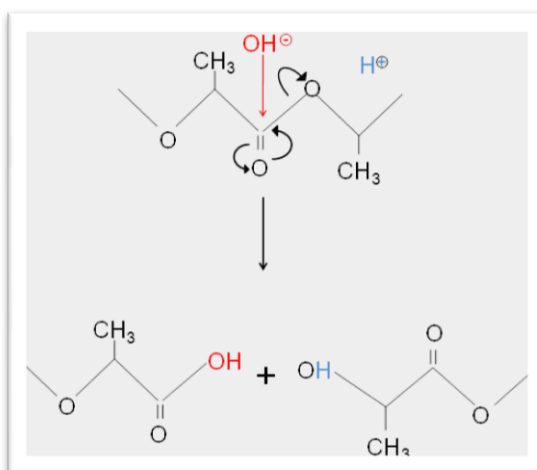


Figure 9: Basic hydrolysis of the ester function of the PDLLA.

### Influence of injection process

The second decrease of Mw takes place during the injection step:

- For the neat polymer, from raw granules to injected specimen, several phenomena (thermal degradation, shearing and hydrolysis catalyzed by temperature) induce the Mw decrease of the polymer (around 40%). It is indeed generally accepted that Polylactic acids are thermally degraded above 160°C.
- For the composite, from composite granules to injected composite, hydrolysis and shearing (increased by the filler) could explain the decrease of Mw (around 85%) during the injection step.

From raw polymer granules to injected composite, the Mw of the polymer matrix decreases from 520 kg.mol<sup>-1</sup> to 40 kg.mol<sup>-1</sup>. Ions release of Bioglass®, during composite granule elaboration appears like a key parameter to understand polymer matrix degradation. Moreover, the effect of shearing and temperature during injection moulding, like degradation parameters for the polymer matrix, is confirmed in our case. But the degradation was accelerated in presence of Bioglass® particles that increased shearing forces, promoting chain scission.

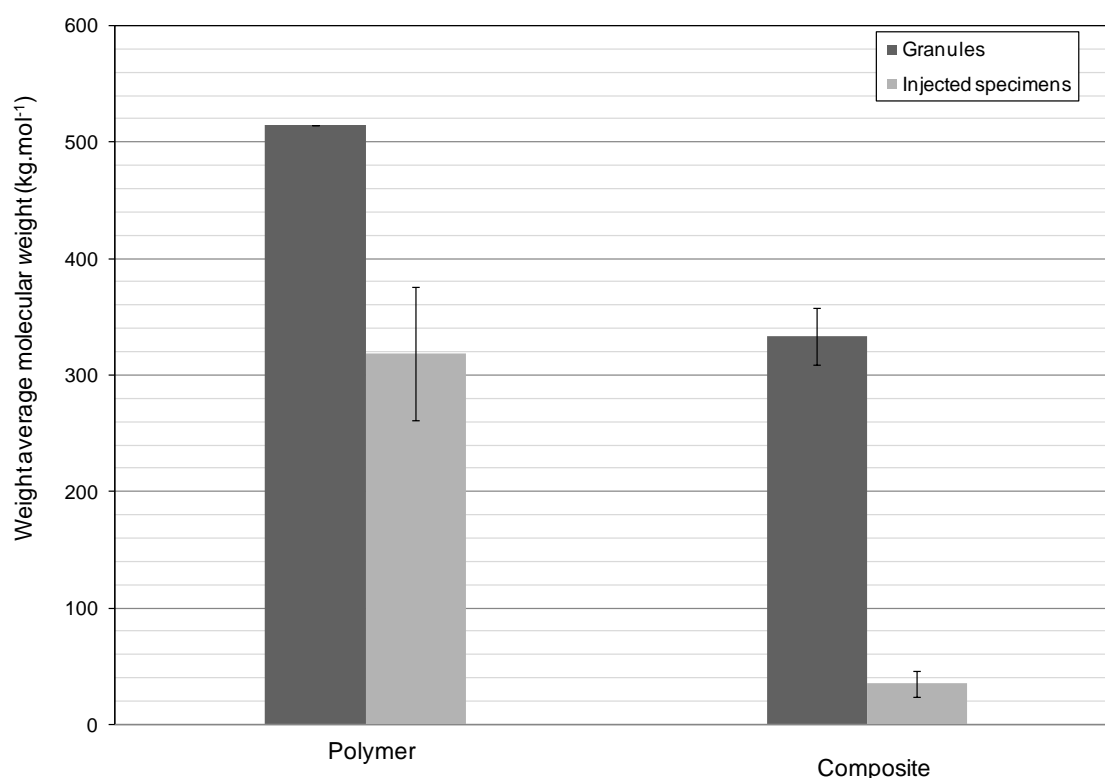


Figure 10: Change in Mw after injection moulding for the neat polymer and after both composite granules elaboration and injection moulding for the composite.

The lower is the Mw of the polymer matrix, the lower will be the resorption time of the matrix. This could be in fact an advantage, if the composite keeps enough mechanical properties until tissue generation. However, in our case, the Mw value (~40 kg.mol<sup>-1</sup>) of the composite obtained by injection moulding is very close to the range of the critical molecular weight (around 18000g/mol<sup>26</sup>) correlated to a quick drop of the mechanical properties. Depending on the site of implantation our composite could lose its mechanical properties very quickly.

Thus, it would be interesting to better control Mw of the composite, in order to adjust the kinetic of degradation *in vivo* to the specifications of the medical devices chosen. For this purpose, a second elaboration route was investigated, in order to understand how the change of parameters (among temperature, shear forces and basic ions release) enables to minimize the degradation of the polymer matrix during the elaboration process.

---

### B.III.2 Improvement of the composite properties with the second elaboration route

The second elaboration route has two different steps: solvent casting and hot pressing. Molecular weight and Vickers hardness measurements have been carried out to characterize the material obtained with this second elaboration method.

#### a)Molecular weight change after hot pressing

---

After hot pressing, Mw of the pressed polymer ( $450\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) was almost the same than that of the polymer granules ( $500\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Fig. 11). At this temperature the degradation phenomenon is very weak. Consequently, the decrease of Mw of the composite matrix after the “pressed samples process” enables to highlight the effect of ions release of Bioglass®, the Mw of the polymer matrix is divided by two in comparison with the Mw of the pressed polymer. The comparison between the Mw of the pressed and injected composite polymer matrices mainly highlights the effect of shearing during the “injection samples process”, the Mw of the composite matrix is divided by five.

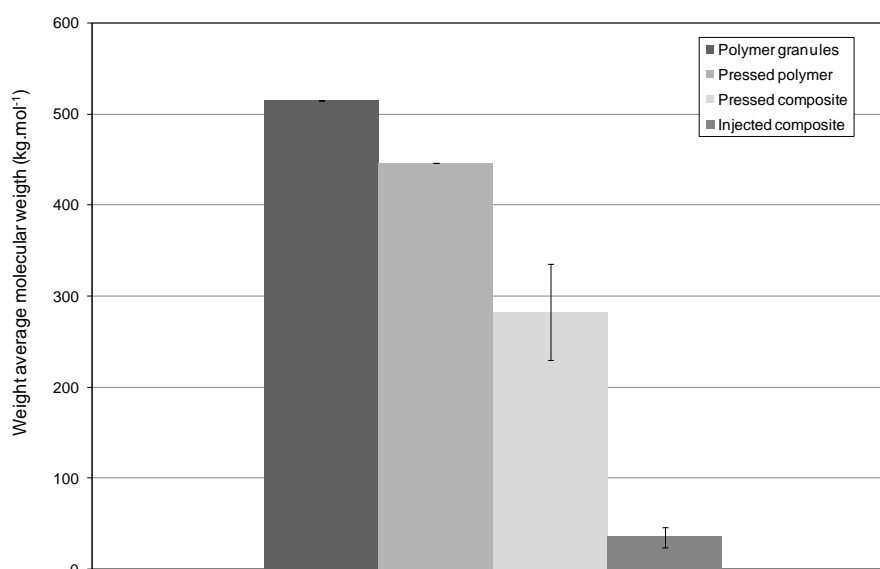


Figure 11: Change in Mw after hot pressing for the polymer and the composite. Mw of the injected composite is also presented for comparison.

b)Vickers hardness after hot pressing

---

In order to show the improvement of the mechanical properties related to the increase of Mw, Vickers hardness was carried out on both injected and pressed polymer and composite. Whereas the value is similar between both polymer samples, Vickers hardness increases of 26% for pressed composite as compared to the injected one and shows a similar value as the pressed polymer (cf. Table 3).

Elaboration process	Materials	Hv (MPa)
<b>Injection moulding</b>	Polymer	159 ± 1
	Composite	129 ± 0
<b>Hot pressing</b>	Polymer	157 ± 5
	Composite	163 ± 6

Table 3: Vickers hardness of the polymer and the composite after injection moulding and hot pressing.

This second elaboration route enables us to prepare a composite with higher Mw (well above de critical molecular weight) that induces a higher hardness. This work shows that it is possible to modify Mw of the polymer matrix by modifying the processing route.

Until now, we are only focused on mechanical properties, but the mechanical properties are closely correlated to the microstructure. The comparison between pressed and injected samples enables to establish the effect of processing parameters on the microstructure.

---

*B.III.3 Microstructure of both injected and pressed materials*

a)Evolution of the microstructure by XRD

---

X-Ray Diffraction (XRD) was carried out on both injected and pressed materials in order to check if the microstructure of the polymer matrix was modified during the process.

XRD patterns are presented for the injected and for the pressed polymers in Figure 12, and for the injected and for the pressed composites in Figure 13. We note a weak cristallinity (~ 10%) of the injected polymer, whereas pressed polymer is amorphous. Both the injected and the pressed composites are amorphous.

Diffractionogram of the pressed polymer presented two amorphous bands between  $2\theta = 10-25^\circ$  and  $30-35^\circ$ . The first amorphous band corresponds to inter-chains length and the second one corresponds to intra-chains length between methyl groups.

The diffractionogram of the injected polymer (cf. Fig.12) exhibits a crystalline peak at  $2\theta = 16.6^\circ$ . This peak is attributed to the most intensive peak of the  $\alpha$  form of PLLA crystallized in a pseudo-orthorhombic unit cell of dimensions:  $a = 10.7 \text{ \AA}$ ,  $b = 6.45 \text{ \AA}$ , and  $c = 27.8 \text{ \AA}$ , in the crystallographic plane (200) and/or (110) which contains  $10_3$  helices<sup>27</sup>.

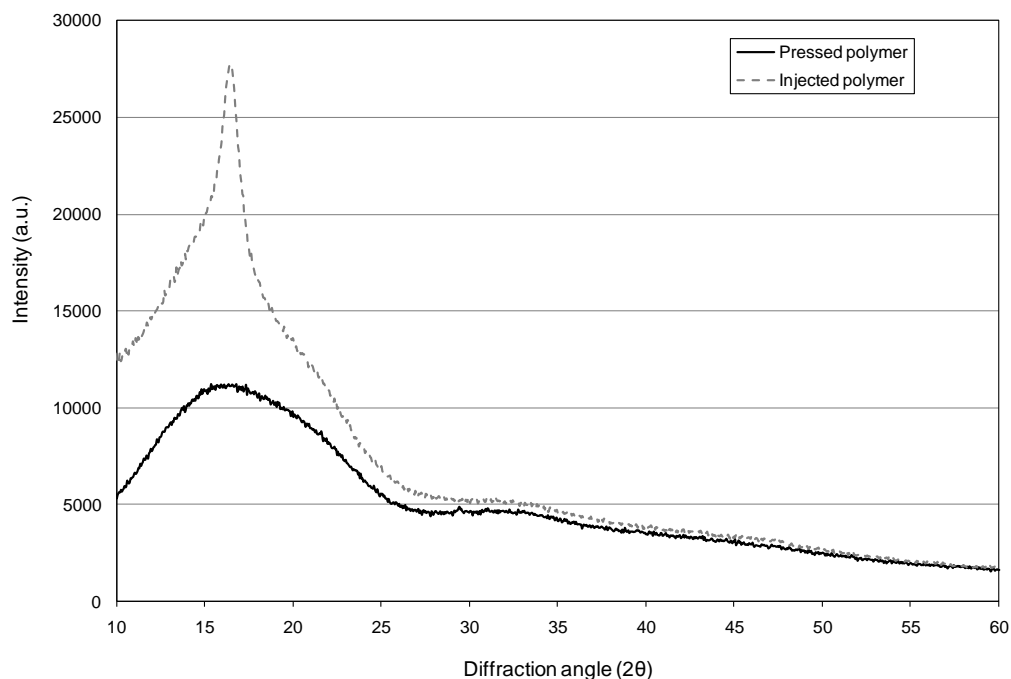


Figure 12: Diffractograms of injected (dotted line) and pressed (full line) polymers.

Diffraction patterns of the pressed and injected composites present the two bands observed on the diffraction pattern of the polymer. But the second band between 30-35° is more intense, due to the contribution of the amorphous band corresponding to interatomic length of the Bioglass®.

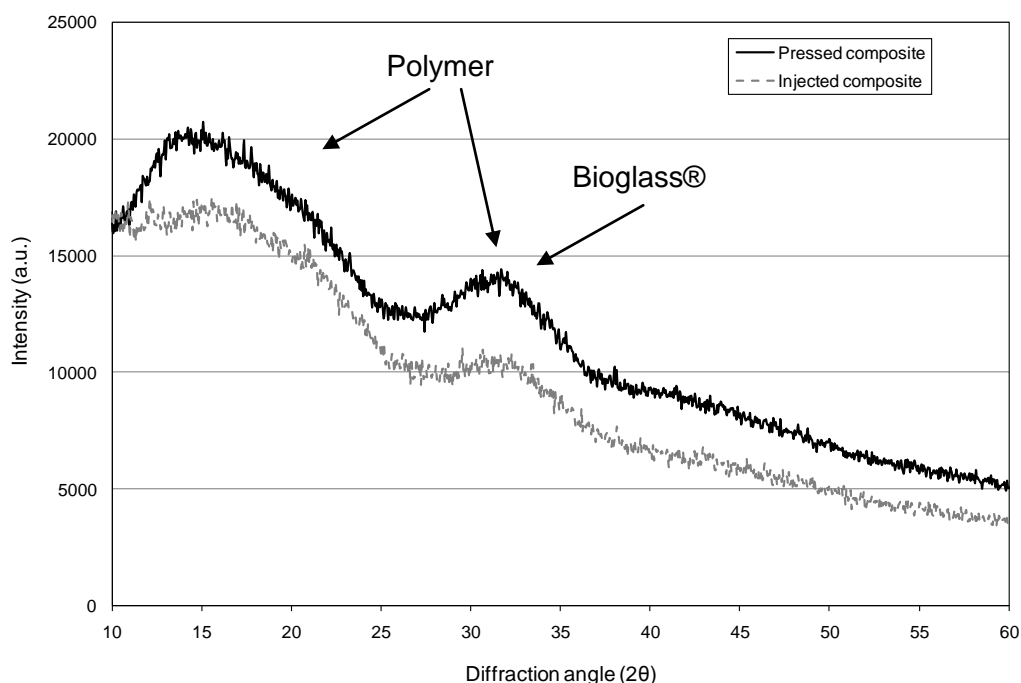


Figure 13 : Diffractograms of injected (dotted line) and pressed (full line) composites.

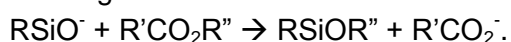
During processing, only the injected polymer crystallizes. Flow-induced crystallization is a phenomenon occurring during injection process that could explain the crystallization of the

polymer. Alignment of the polymer chains during injection process may promote their crystallization. The lack of crystallization in the case of the injected composite could be due to the presence of Bioglass® particles which may limit the ordering of the chains. The size of the polymer chains could also be an explanation. When the mixture cold down in the mold only the short chains have enough time to relax (return to the random coil state) before the temperature of the mixture reaches a value lower than the glass transition temperature. The short polymer chains of the injected composite relax quickly than the long polymer chains of the injected polymer.

#### b) Reaction occurring between polymer and Bioglass® by FTIR analysis

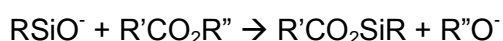
---

Blaker et al.<sup>12</sup> have reported a possible reaction between polymer and Bioglass® during processing:



In order to confirm their hypothesis and to determine the effect of the process on such reaction, FTIR was performed on both injected and pressed polymers and composites (Fig. 14).

We can notice that all materials exhibit a peak at  $1745\text{ cm}^{-1}$  attributed to the carbonyl function of the ester group that is known to appear at a wavelength between  $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$  (cf. Fig. 14). We also observe the appearance of a stretching band at  $1600\text{ cm}^{-1}$  in each composite. This band can be attributed to the stretching band of carbonyl function of a new ester group, but it can also be due to the formation of an ethylene bond by thermal decomposition of the polymer<sup>20</sup>. As this peak does not appear on the injected polymer spectra, it must be the signature of a new ester group. This result suggests that a chemical reaction occurred between polymer and Bioglass® (or ions released by Bioglass®) leading to the formation of another ester function according the following scheme:



The reaction proposed here seems more realistic than this reported by Blaker et al.<sup>12</sup>. In fact, it is difficult to understand how the  $\text{RSiO}^-$  anion can attack the  $\text{R}''$  group rather than the electrophile carbon of the ester group as we propose.

The new chemical group neighboring of the ester group induces a shift of the carbonyl function peak towards the lower wavenumber ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Besides the ratio of the height of the peak at  $1600\text{ cm}^{-1}$  divided by that at  $1745\text{ cm}^{-1}$  is more important for the injected composite than for the pressed composite, suggesting a more important reaction occurring between polymer and Bioglass® during injection process.

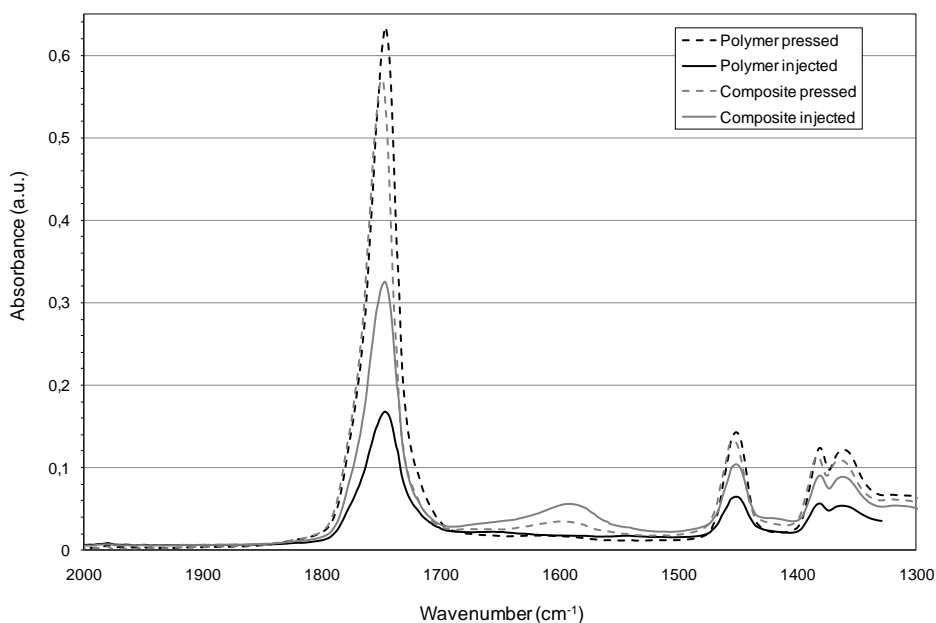


Figure 14: FTIR spectra of the pressed polymer and composite (dotted lines) as well as the injected polymer and composite (full lines).

Our results show that Mw decreases during process, that a reaction between Bioglass® and polymer takes place and that the flow induced crystallization could happen during injection process. One of the most interesting ways to show the effect of the previous parameters on mechanical properties at small strain is to perform dynamic mechanical analysis (DMA) on both injected and pressed polymers and composites. The effect of polymer change (microstructural and chemical) could be studied.

#### c) Dynamic mechanical analysis of injected and pressed specimens

---

Figure 15 shows the evolution of the storage modulus for the pressed polymer and composite. As expected, pressed composite modulus is higher than polymer one, and this difference is more important in the rubber state. This increase of the modulus with addition of Bioglass® is consistent with the results obtained in part C.1.2.



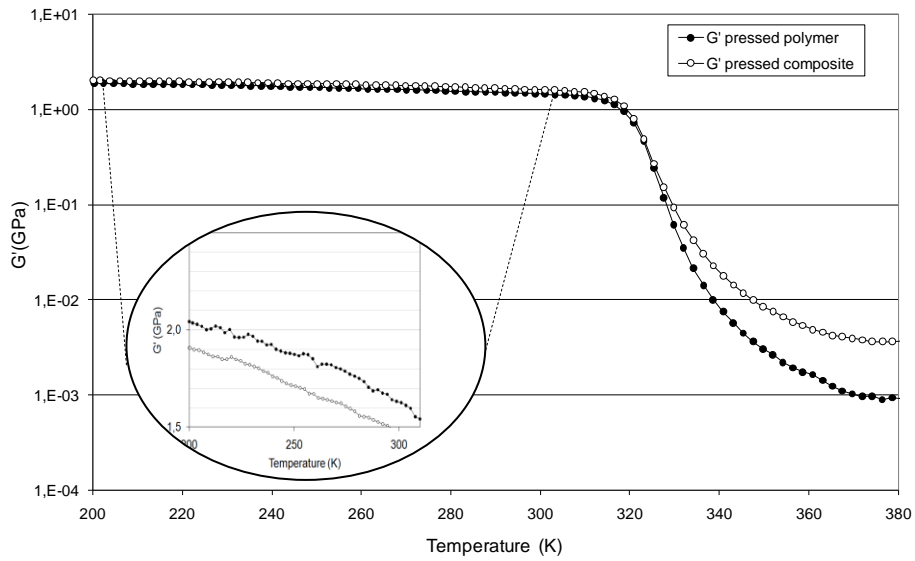


Figure 15: Storage modulus versus temperature for the pressed polymer and composite.

Figure 16 shows the evolution of storage modulus and loss modulus with temperature for pressed and injected polymers. The data were normalized by their values at 200K to facilitate the comparison between both elaboration methods.

During the transition between glassy to rubber state, the modulus decreased earlier for the pressed polymer than for the injected one, and in the rubber state, the storage modulus of the injected polymer is ten times higher than pressed one.

On the loss modulus curves, we observe a shift to higher temperature of  $\alpha$  relaxation for the injected polymer. The peaks related to  $\alpha$  relaxation of pressed and injected polymers appeared at 50°C and 56°C respectively. This shift to higher temperature may be due to the cristallinity of the injected polymer matrix, as observed on XRD. Cristallinity of the polymer can also explain the higher elastic modulus in the rubber state of the injected polymer.

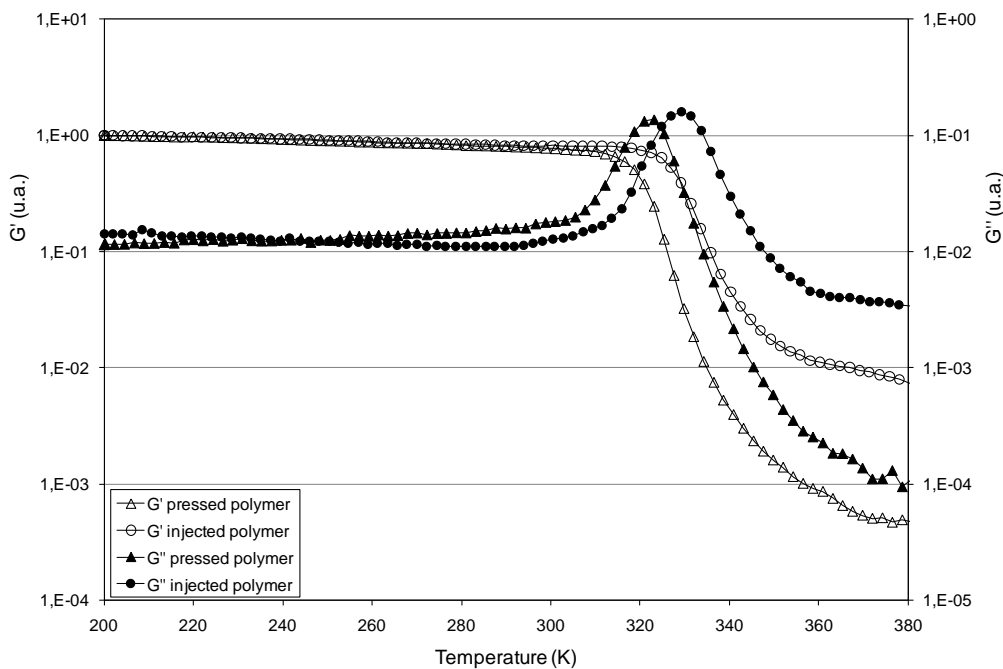


Figure 16: Relative storage and loss modulus versus temperature for pressed and injected polymers.

The storage modulus according to the temperature for both injected and pressed composites was similar (Fig. 17). In the case of composite samples we observed the appearance of a second relaxation starting at  $-10^{\circ}\text{C}$ , contrary to the neat polymer samples. This new relaxation is more intense for the injected composite. It could be the signature of short chains created during the processing as explained before.

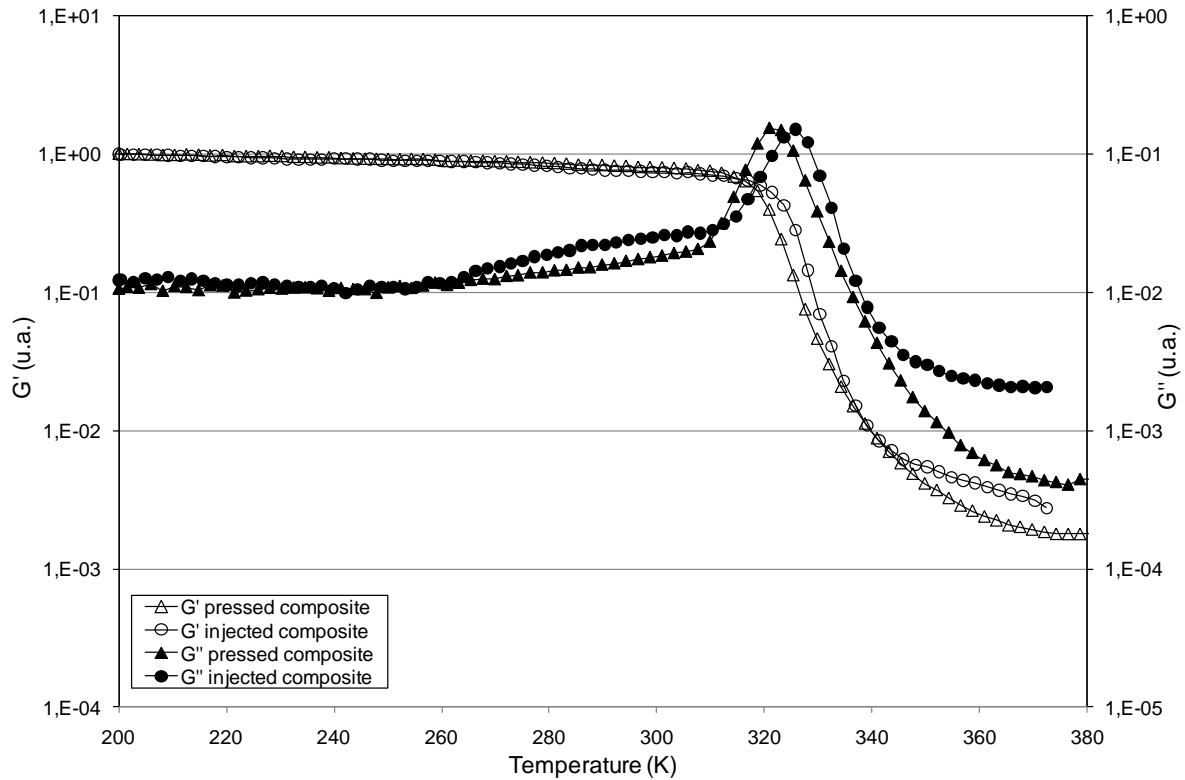


Figure 17: Relative storage and loss modulus versus temperature for pressed and injected composites.

Temperature of  $\alpha$  relaxation is similar between pressed polymer and composite, around  $50^{\circ}\text{C}$ . This result is due to an amorphous polymer microstructure and a molecular weight of polymer well above the critical molecular weight for both materials. Even if chemical interactions take place between Bioglass® and polymer, the little surface area of micronic fillers doesn't enable to develop an enough large interfacial region with restricted mobility of polymer chains which it could be possible to observe the signature on the DMA curve (shift of  $\alpha$  relaxation temperature towards higher temperature).

Nazhat et al.<sup>28</sup> with a PDLLA matrix reinforced with HA particles (40 wt.%) showed that addition of HA induced a broadening as well as an increased temperature of the  $E''$  peak. They attributed this shift of  $\alpha$  relaxation temperature to a high surface area in fillers and a strong filler-polymer interaction. This interaction would lead to the creation of an adsorbed layer more rigid than the polymer matrix,  $\alpha$  temperature relaxation of this layer being greater than that of the matrix. But even if some polymer chains are absorbed on the HA particles, it cannot explain such a shift of the temperature of the relaxation and the strength of the relaxation. Indeed only some polymer chains are absorbed on the particles (little surface area), majority of them are not linked to the particles. Moreover DSC experiments didn't

show any change of glass transition temperature between PDLLA film and PDLLA composite film.

In our case, the shift that we observed on the injected polymer can be attributed to the crystallization of the matrix, as confirmed by XRD. Similar conclusions were observed by Bensason et al.<sup>29</sup> on ethylene-octene semi crystallin copolymers.

## B.IV. CONCLUSION

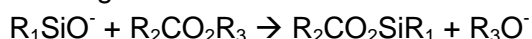
From our results, it appears that the composite made of Bioglass® particles in a resorbable polymer matrix, has lower tensile strength and strain to failure compared to the neat polymer. Only the elastic modulus increases. Moreover addition of Bioglass® particles changes the tensile behavior from ductile to brittle. This brittle behavior of the composite in tension may be due to a weak interface between polymer and Bioglass® particles, leading to the formation of some micro-voids around the particles during loading. However, this low interaction between polymer and Bioglass® particles cannot explain the decrease of the compressive yield stress and the Vickers hardness of the composite as compared to the neat polymer. This reduction of mechanical strength is also associated to a drop of the matrix properties, as clearly shown by the decrease of molecular weight during processing. This reduction in Mw can be explained by high temperature and important shear stresses encountered during injection moulding.

The presence of Bioglass® particles can also trigger the decrease of Mw. The molecular weight reduction occurred also during the first step of granules elaboration by solvent route. Bioglass® particles in solution could release ions, triggering the breakage of ester links.

Average molecular weight of the injected composite being close to the critical molecular weight, a better control of the molecular weight is essential to tailor the mechanical properties of the material and its kinetic of degradation *in vivo*. A better understanding of the relation between properties and microstructure is essential to improve the elaboration process.

Another processing route with 'softer' conditions (lower processing temperature and lack of shearing stress) was carried out to estimate the impact of these parameters on the polymer matrix properties. Hot pressing method allows an increase of composite molecular weight associated to an increase in composite hardness (hence in yield stress). These results highlight the impact of the molecular weight on the final mechanical properties of the composite and mainly the importance to reach a molecular weight of the polymer matrix well above the critical molecular weight.

Thanks to FTIR measurements, a reaction (nucleophile attack) between Bioglass® or ions released and polymer is proposed to explain the Mw decrease during the solvent route processing:



This reaction between Bioglass® particles and polymer chains was observed mainly on the injected composite. Two reactions are possible:

- Reaction with Bioglass® particles: in this case, the reaction remains minor because it takes place only with polymer chains that are present around the Bioglass® particles;
- Reaction with alkaline ions released by the Bioglass®: in that case all the polymer chains may react depending on ions diffusion.

This study has demonstrated that during process, chemical reaction can occur between polymer and Bioglass®.

The second relaxation observed by DMA for the injected composite at lower temperature suggested the presence of small chains that would relax at lower temperature. Breaking of the small chains was promoted by the hard conditions involved during injection: high temperature and shear stresses increased by the presence of Bioglass® particles. The presence of Bioglass® particles increases thus the shear stresses on the polymer chains.

The slight crystallization of the injected polymer led to a higher storage modulus in the rubber state compared with the pressed polymer and a shift to higher temperatures of  $\alpha$  relaxation temperature. Crystallization of the polymer matrix after injection was favored by orientation of the polymer chains. Inversely in the composite, Bioglass® particles do not promote organization of the polymer chains and so do not permit crystallization.

Thus several prospect can be explored in order to improve the molecular weight of the composite. The first step could be to optimize injection molding parameters, by adding processing aids in order to minimize the shearing during injection and to limit the molecular weight reduction during the processing. We can also limit the molecular weight reduction by interfering on the 45S5 Bioglass® releasing. Indeed this study confirms that the presence of this Bioglass® in solution with the polymer can cause polymer chain scission. It has already been demonstrated that thermal treatment of the 45S5 Bioglass® decreases its reactivity, and consequently ions releasing<sup>30</sup>. Filling the polymer matrix with this glass-ceramic may limit the polymer chains break, and produce attractive composites with higher molecular weight. Controlling composite molecular weight would permit a better tailoring of the composite degradation kinetic *in vivo*. The time of degradation required for each bone application being different, be able to elaborate composites with various molecular weight would allow replying to the specifications of different bone devices. Another alternative would be to process the composite granules by a dry route method, which would prevent the harmful effect of the Bioglass® salting out. All these alternatives would allow to tailor mechanical properties of the composite and in particular increase mechanical strength in order to better mimic bone mechanical properties.

Despite the reduction in molecular weight, and consequently in the mechanical properties of the composite, this material exhibits sufficient mechanical properties for some bone repair applications and may exhibit adequate *in vivo* resorption (see Chapter D). Indeed, it presents a Young's modulus value approaching the lower bound for cortical bone. Its yield tensile stress value is comprised between trabecular and cortical bone values. And above all, composite material exhibited an appropriated strain to failure, close to that of human cortical bone. But controlling molecular weight of the composite can be a method to adjust the time of degradation *in vivo*, and then to adapt composite properties to the specifications researched by the medical device.

## References

1. Engh CA, Young A, Engh CA, Hopper RH. Clinical consequences of stress shielding after porous-coated total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research* 2003; pp. 157-163.
2. Puget J. Prothèse totale de hanche. Les choix. *Cahiers d'enseignements de la SOFCOT* 2005.
3. Bonfield W. Hydroxyapatite-reinforced polyethylene as an analogous material for bone replacement. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988, 523:173-177.
4. Todo M, Park SD, Arakawa K, Takenoshita Y. Relationship between microstructure and fracture behavior of bioabsorbable HA/PLLA composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 2006, 37:2221-2225.
5. Verheyen CCPM, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behavior. *Journal of Biomedical Materials Research* 1992, 26:1277-1296.
6. Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials* 1999, 20:859-877.
7. Aunoble S, Clément D, Frayssinet P, Harmand MF, Le Huec JC. Biological performance of a new  $\beta$ -TCP/PLLA composite material for applications in spine surgery: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2006, 78:416-422.
8. Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E. Poly(D,L-lactide/ $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 2000, 21:2147-2154.
9. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Närhi T, Yli-Urpo A, Seppälä J. In vitro evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2002, 23:2143-2150.
10. Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Närhi T, Jokinen M, Seppälä J, Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* 2004, 25:575-581.
11. Niemelä T, Niiranen H, Kellomäki M, Törmälä P. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I: Initial mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:235-242.
12. Blaker JJ, Bismarck A, Boccaccini AR, Young AM, Nazhat SN. Premature degradation of poly( $\alpha$ -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites. *Acta Biomaterialia* 2009, 6:756-762.
13. Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006, 17:967-978.
14. Kasuga T, Ota Y, Nogami M, Abe Y. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials* 2001, 22:19-23.
15. Bergsma JE, De Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, 16:25-31.
16. Wang M, Joseph R, Bonfield W. Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* 1998, 19:2357-2366.
17. Converse GL, Yue W, Roeder RK. Processing and tensile properties of hydroxyapatite-whisker-reinforced polyetheretherketone. *Biomaterials* 2007, 28:927-935.
18. Gay S, Arostegui S, Lemaitre J. Preparation and characterization of dense nanohydroxyapatite/PLLA composites. *Materials Science and Engineering: C* 2009, 29:172-177.

19. Södergard A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress In Polymer Science* 2002, 27:1123-1163.
20. Kopinke FD, Remmler M, Mackenzie K, Möder M, Wachsen O. Thermal decomposition of biodegradable polyesters--II. Poly(lactic acid). *Polymer Degradation and Stability* 1996, 53:329-342.
21. McNeill IC, Leiper HA. Degradation studies of some polyesters and polycarbonates.1. Polylactide: Degradation under isothermal conditions, thermal degradation mechanism and photolysis of the polymer. *Polymer Degradation and Stability* 1985, 11:309-326.
22. Zenati R, Pacard E. Method for preparing a composite material, resulting material and use thereof. Patent WO/2008/116984. 2 Octobre 2008.
23. Rajendran V, Nishara Begum A, Azooz MA, El Batal FH. Microstructural dependence on relevant physical-mechanical properties on SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> biological glasses. *Biomaterials* 2002, 23:4263-4275.
24. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003, 24:2161-2175.
25. Hench L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1998, 81:1705-1728.
26. Dorgan JR, Williams JS, Lewis DN. Melt rheology of poly(lactic acid): Entanglement and chain architecture effects. *Journal of Rheology* 1999, 43:1141-1155.
27. Peurton F. Nanocomposites à matrice thermoplastique et renforts plaquettaires: relations élaboration-structure-propriétés. *Génie des matériaux* 2008. Vol. pHD, Page 198.
28. Nazhat SN, Kellomaki M, Tormala P, Tanner KE, Bonfield W. Dynamic mechanical characterization of biodegradable composites of hydroxyapatite and polylactides. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, 58:335-343.
29. Bensason B, Minick J, Moet A, Chum S, Hiltner A, Baer E. Classification of homogeneous ethylene-octene copolymers based on comonomer content. *Journal of Polymer Science: part B: Polymer Physics* 1996, 34:1301-1315.
30. Lefebvre L. Développement de bioverres poreux pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire. *Génie des matériaux* 2007. Vol. PhD, Page 183.

## Chapter C

### C. ARTICLE 2 (Soumis à Journal of Biomedical Materials Research Part B)

# Crystallization processes at the surface of Polylactic Acid - Bioglass® composites during immersion in Simulated Body Fluid

<b>C.I. Introduction</b>	<b>98</b>
<b>C.II. Materials and methods</b>	<b>99</b>
C.II.1 Materials	99
C.II.2 Bioactivity testing	100
C.II.3 X-ray diffraction and Rietveld analysis	100
C.II.4 Microscopic observation	101
C.II.5 Polymer weight loss	101
<b>C.III. Results</b>	<b>101</b>
C.III.1 Visual inspection and SEM observation	101
C.III.2 Follow up of crystallization by XRD analysis	104
<b>C.IV. Discussion</b>	<b>110</b>
<b>C.V. Conclusion</b>	<b>112</b>

Dans cette partie nous allons étudier la cristallisation ayant lieu à la surface de composites polyacide lactique – bioverre au cours de l'immersion dans un fluide biologique. Des composites mis en forme par injection et contenant différents taux de bioverre 45S5 (0, 20, 30 et 50% en masse) vont être testés pendant 2 mois et comparés avec du bioverre seul. L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet du taux de bioverre sur la cinétique de cristallisation de l'hydroxyapatite. Un scénario de cristallisation en fonction de la composition sera aussi proposé.

## Crystallization processes at the surface of Polylactic Acid – Bioglass® composites during immersion in Simulated Body Fluid

Nathalie Ginsac<sup>a,b</sup>, Jean-Marc Chenal<sup>a,b</sup>, Sylvain Meille<sup>a,b</sup>, Elodie Pacard<sup>d</sup>, Rachid Zenati<sup>d</sup>, Daniel J. Hartmann<sup>a,c</sup>, Jérôme Chevalier<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, CNRS

<sup>b</sup> INSA-Lyon, MATEIS UMR5510, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>c</sup> UPSP 2007.03.135 RTI2B, 8 avenue Rockefeller 69008 Lyon, France

<sup>d</sup> Noraker, 13 Avenue Albert Einstein, 69100 Villeurbanne, France

### Abstract

We report on the crystallisation processes occurring at the surface of PDLLA-Bioglass® composites immersed in Simulated Body Fluid. Composites manufactured by injection moulding and containing different amounts (0, 20, 30 and 50wt%) of 45S5 Bioglass® particles were tested for durations up to 56 days and compared with Bioglass® particles alone. Crystallisation processes were followed by visual inspection, X-Ray diffraction (with Rietveld analysis) and Scanning Electron Microscopy. Both calcite and hydroxyapatite were formed at the surface of all materials, but their relative ratio was dependent on the Bioglass® content and immersion time. Hydroxyapatite was always the major phase after sufficient immersion time, insuring bioactivity of such composites especially for Bioglass® content higher than 30 wt.%. A scenario of crystallisation is proposed. Rapid degradation of the composites with 50 wt.% was also observed during immersion. Therefore, composites with 30 wt.% of Bioglass® particles seem to exhibit the best balance between bioactivity and stability at least during the first weeks of immersion in contact with body fluids.

### C.I. INTRODUCTION

Bioresorbable polymers, especially polyesters such as polyglycolic acid (PGA), polycaprolactone (PCL) or polylactic acids (PLA) are of great interest for medical applications<sup>1-4</sup>. They are currently used as bioresorbable implants in cranio-maxillo facial<sup>5, 6</sup>, orthopaedic<sup>7-9</sup> or spine surgery<sup>10</sup> and for trauma treatments<sup>11</sup>. Being bioresorbable, they avoid a second operation to remove the implant. Besides, one of their major interests is the possibility to process complex shapes with conventional manufacturing techniques such as injection moulding. However, in contrast with calcium phosphate ceramics and glasses, such polymers do not promote natural apatite formation at their surface and bone in-growth *in vivo*. A strategy followed these past 10 years by several teams therefore consists in incorporating a 'bio-active' ceramic or glass component into a biodegradable polymer<sup>12-17</sup>. Among 'bio-active' ceramics, 45S5 Bioglass® (45 wt.% SiO<sub>2</sub>, 24.5 wt.% Na<sub>2</sub>O, 24.5 wt.% CaO, 6 wt.% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) has the best ability to promote the development of a hydroxycarbonate apatite (HAC) layer on its surface after immersion in a biologic fluid *in vitro* and to promote bone regeneration *in vivo*<sup>18</sup>. The series of reactions by which HAC forms at the surface of



Bioglass® is well documented<sup>19</sup>. In brief, it occurs by a succession of (1) fast exchange of alkali ions from the glass with hydrogen ions from the body fluid, (2) glass network dissolution, (3) silica-gel polymerization and (4) chemisorption and crystallisation of a HAC layer. Such process is responsible for the strong interfacial bonding with bone *in vivo*.

Much less is known concerning the bioactivity of 45S5 Bioglass® included in a polymer matrix, even if some authors have shown that such composites may exhibit apatite formation on their surface<sup>17, 20</sup>. In particular, the conditions and the sequences by which hydroxyapatite forms on bioresorbable polymer-Bioglass® composites remains to be fully clarified. The aim of the present study is then to follow in details the crystallisation processes occurring at the surface of such composites, as a function of 45S5 Bioglass® ratio.

## C.II. MATERIALS AND METHODS

---

### C.II.1 Materials

A poly(L,DL)lactide (PDLLA) with a 70L/30DL ratio and an inherent viscosity between 5.7 and 6.5 dl/g was obtained from Boehringer Ingelheim, Germany (Resomer® LR708). 45S5 Bioglass® particles were obtained from high purity SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub> and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> powders. The powders were weighted, mixed and melted in a Pt crucible for 4h at 1400°C with a decarbonation step (5h at 950°C). The melt was then quenched in water and ground in ethanol to a fine powder (particle size distribution of 3 µm). Quenching was fast enough to retain a completely amorphous material, as checked by X-Ray Diffraction (XRD). Composite granules with different contents of Bioglass® particles (20, 30 and 50 wt.%) were processed following a protocol patented (Patent WO2008116984 (A2))<sup>21</sup>. Briefly, Bioglass® particles were first put in suspension in a solvent, then polymer was added and mixed to reach the desired Bioglass® / PDLLA ratio. The suspension was then precipitated in water. The precipitate was milled and sieved to obtain granules of mean diameter 1 mm. Polymer alone (called 'P' hereafter) or composite granules with 20, 30 and 50 wt.% Bioglass® (called 'C20, C30 and C50') were injection moulded into plates of dimensions 70x45x3 mm<sup>3</sup> with an industrial injection moulding machine (ENGEL Victory, Schwertberg, Austria). Specimens were machined from these plates in parallelepipeds of dimensions 10x10x3 mm<sup>3</sup>.

### C.II.2 Bioactivity testing

Bioactivity testing was conducted on the Bioglass® particles and P, C20, C30 and C50 injection-moulded samples, following the international standard ISO 23317<sup>22</sup>. Samples were immersed in 30 ml of Simulated Body Fluid (SBF), with a ratio of sample surface to SBF volume of 0.1cm<sup>2</sup>/ml, for different periods from 1 to 56 days at a constant temperature of 37°C. In the case of Bioglass® particles, additional immersion tests were conducted, with shorter duration (from 0.5 to 24 h). The amount of Bioglass® particles immersed in SBF was chosen so as to get the same concentration of Bioglass® than that of the C30 specimens, i.e. 100 mg of particles in 30 ml of SBF. The Bioglass® concentration in SBF for each material is presented in table 1. SBF solution was changed twice a week (*dynamic mode*) to prevent saturation of the solution and insure pH stability to a value ranging between 7.2 and 7.4, to mimic as far as possible physiological environment. After the test, each sample was rinsed with deionised water and dried in a desiccator during at least one week.

Materials	Bioglass® concentrations (mg/ml)
C20	2.9
C30	4.6
C50	8.4

Table (1): Bioglass® concentrations in SBF solution for each composite C20, C30 and C50.

### C.II.3 X-ray diffraction and Rietveld analysis

The nature and content of crystalline phases formed at the surface of the samples after a given period in SBF was determined by X-ray diffraction. The measurements were performed on a Bruker Advance D8 diffractometer, using CuK $\alpha$  radiation in a  $\Theta$ -2 $\Theta$  mode (starting and final 2 $\Theta$ : 8 and 60°, step size: 0.05°, time per step: 1.5s, operation parameters: 40kV and 40 mA). The relative content of the crystalline phases and their crystal size was quantified by Rietveld analysis (Topas®, Bruker, Madison, USA).

Depending on the thickness of the crystallized layer at the samples surface, two types of analysis were performed:

When the crystallized layer thickness was important (typically larger than a few microns, estimated from Eva® software), the peaks related to the crystalline phases were well defined on the XRD patterns. In that case, Rietveld analysis was possible directly after a simple subtraction of the background (method 1).

When the crystallized layer thickness was small (i.e. less than a few microns), X-rays penetrated into the bulk and the amorphous signature of the polymer or the composites was predominant. In that case, XRD pattern of the raw polymer or composite was subtracted from the specimen pattern, and was then treated with Topas for Rietveld analysis (method 2).

#### *C.II.4 Microscopic observation*

Scanning Electron Microscopy (SEM, FEG XL30) was used to observe the morphology of the crystals at the surface of the samples after immersion in SBF. Samples were gold coated (20 nm thickness) prior to the observation. The composition of the crystalline phases was determined by energy dispersive spectroscopy (EDX) at an accelerating voltage of 10 kV.

#### *C.II.5 Polymer weight loss*

Polymer weight loss in the composites after immersion in SBF was quantified from Thermal Gravimetric Analysis (TGA) measurements. After a given duration of immersion in SBF, each sample was submitted to a thermal treatment (from 30 to 450°C at 20°C/min) to record the amount of polymer burnt during heating. The polymer released during TGA corresponds to the polymer not degraded during immersion in SBF. Therefore, the amount of polymer degraded during immersion in SBF could be deduced by subtracting the weight loss attributed to the polymer burnt during TGA from the initial weight of polymer inside the samples.

### **C.III. RESULTS**

#### *C.III.1 Visual inspection and SEM observation*

After gold coating prior to SEM observation, the samples exhibited a different visual appearance depending on immersion time in SBF and on composition (see fig. 1).



Figure 1: Optical images of the polymer (P) and the composites C20, C30 and C50 from 1 to 56 days of immersion in SBF.

Some samples (or part of samples) appeared bright, while other samples (or part of samples) appeared dark. In summary, P and C20 samples were all bright, while the dark area increased with immersion time in C30 and more rapidly in C50. SEM observations were therefore conducted on both types of regions (see examples in fig. 2 and fig.3) and for the different materials.

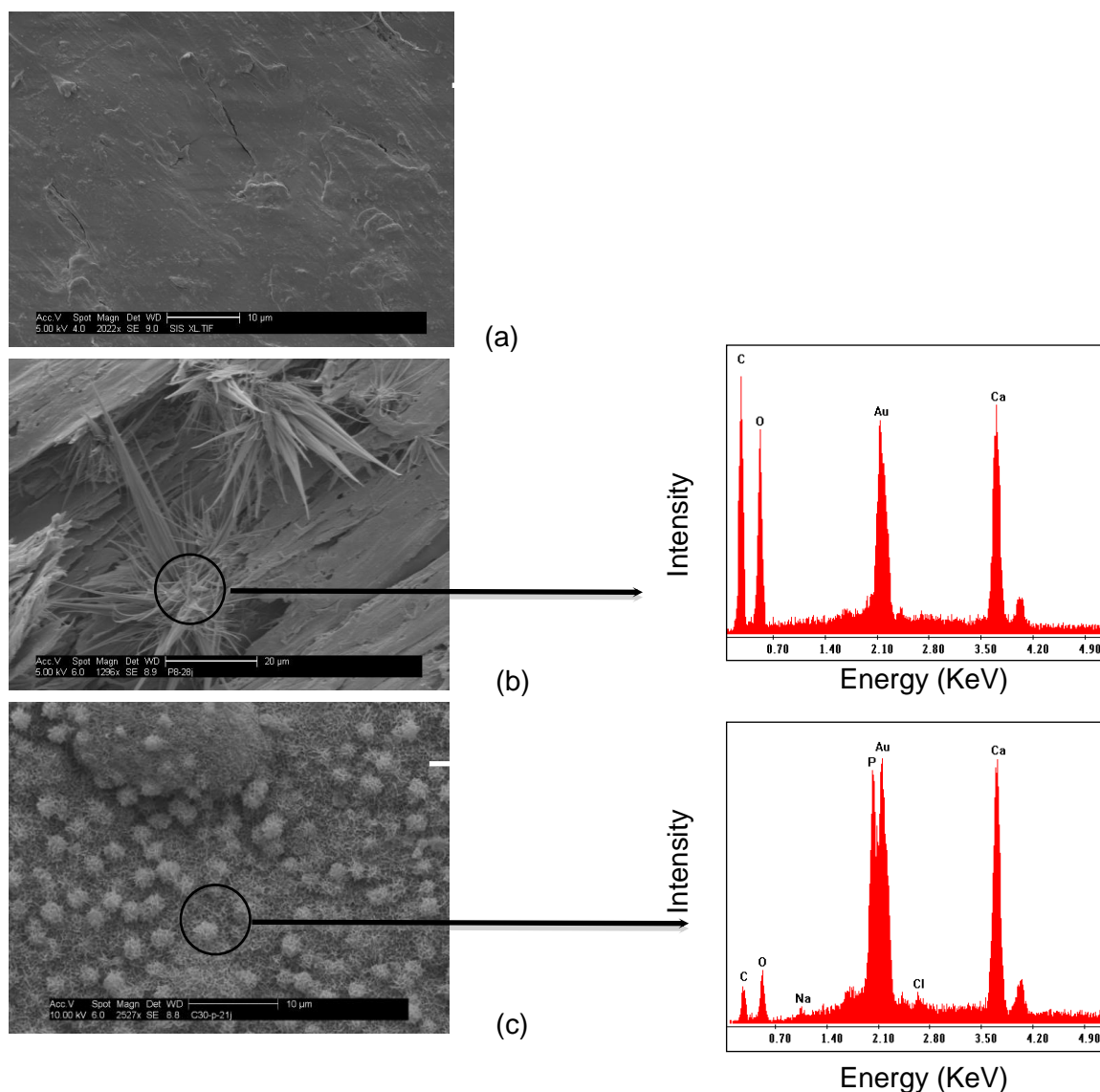


Figure 2: SEM images of (a) the surface of the polymer after 56 days of immersion in SBF, (b) calcite crystals at the surface of C20 observed after 28 days, (c) HA layer at the surface of C30 after 21 days in the dark zone and their respective EDX analysis.

P samples were all free of crystallisation at the surface, even for long immersion time (fig. 2a). The bright aspect of the samples was therefore due to the low roughness of the samples, reflecting the visible light. Although C20 samples were all bright, careful examination of their surface showed the presence of isolated needle like crystals for short duration associated to isolated and small ‘cauliflower’ HA crystals for longer duration. A micrograph of such needle crystal is shown in fig. 2b. EDX spectra performed on these crystals showed the presence of Ca, C and O in their composition, suggesting the presence

of calcite (confirmed hereafter with XRD). Bright surfaces were therefore attributed either to a surface completely free of crystallisation (P) or to a localised crystallisation, mainly of calcite, unable to change the reflectivity of the surface.

In contrast, the dark regions of C30 and C50 exhibited a layer of crystals with ‘cauliflower’ morphology typical of HA crystallization (see fig. 2c). EDX analysis performed on these crystals confirmed that such crystals were calcium phosphates with a Ca/P ratio close to 1.67. Figure 3a shows a layer of HA crystals on C50 observed after one day of immersion, suggesting a very high bioactivity of this composite. The darkness observed in both C30 and C50 is therefore attributed to the rough HA layer at the surface, decreasing the reflectivity of the samples.

Another information given from simple visual inspection was that C50 was degraded by immersion in SBF. Cracks were visible even after one day and samples were crumbled into pieces after 3 days. This is confirmed by SEM observations of figure 3b, showing the degradation of the polymer matrix, while Bioglass® particles were still present (but covered with HA crystals). Such degradation was not visible for the other compositions. Quantitative follow up of the degradation was obtained via TGA analysis of the samples. Figure 4 shows the evolution of the polymer content in the composites versus time. The polymer ratio was almost constant for C20 and C30, while it dropped on C50 (from 50% before immersion to less than 25% after 56 days in SBF).

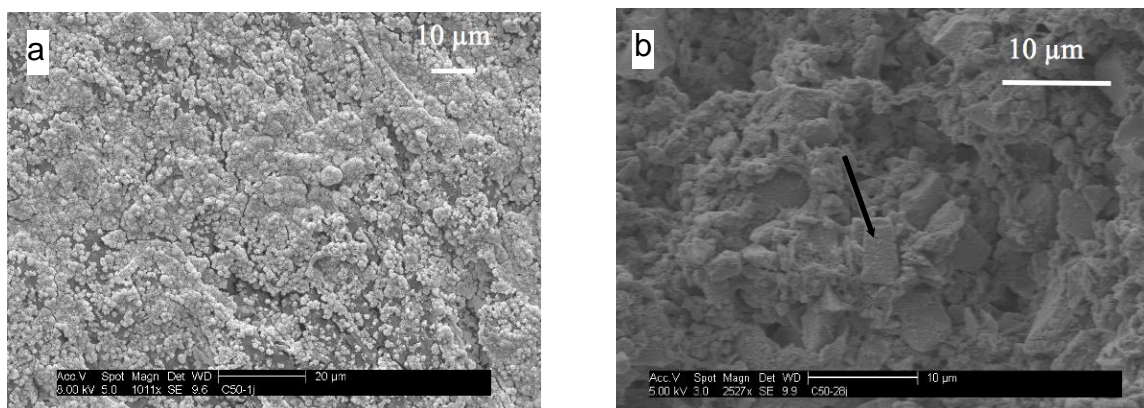


Figure 3: SEM images of C50 after (a) 1 day and (b) 28 days of immersion in SBF.

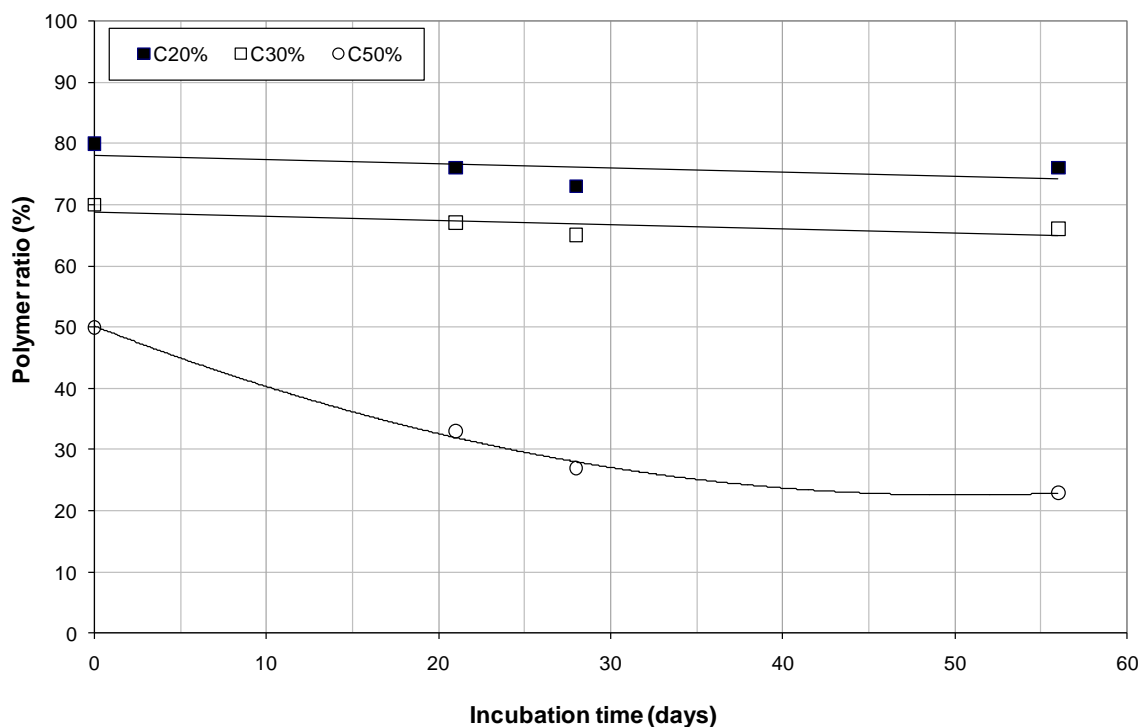


Figure 4: Polymer ratio as a function of immersion time in SBF for each composite material using TGA analysis.

---

### C.III.2 Follow up of crystallization by XRD analysis

#### a) Crystallization on Bioglass® particles

---

A large number of studies were already dedicated on HA crystallisation at the surface of Bioglass®<sup>23-28</sup>. Our results confirm the major results obtained so far on 45S5 Bioglass®, i.e. crystallization of HA at the surface of the particles immersed in SBF. In agreement with some authors<sup>29-31</sup>, the presence of calcite is also observed for the shortest durations (less than 24 hours). Figure 5 shows XRD patterns obtained on the Bioglass® particles after respectively 17 hours and 28 days in SBF. On one side, calcite is observed after 17 hours of immersion in SBF, while HA peak is not well defined. On the other side, only HA is observed at 28 days with very well defined peaks. The evolution of the intensity of the major peak of calcite (104) and of HA (211) versus time is plotted in figure 6. Each data point represents the average of three measurements. Error bars indicate the precision of  $\pm 300$  cps in the intensity. The calcite content measured by XRD increases from 1 hour and reaches a maximum before 10 hours of immersion. The decrease in calcite (104) peak intensity was associated to a simultaneous increase of the HA (211) peak. This may be explained by a rapid crystallisation

of calcite during a first stage, followed by a slower, but predominant crystallisation of HA that covers calcite crystals.

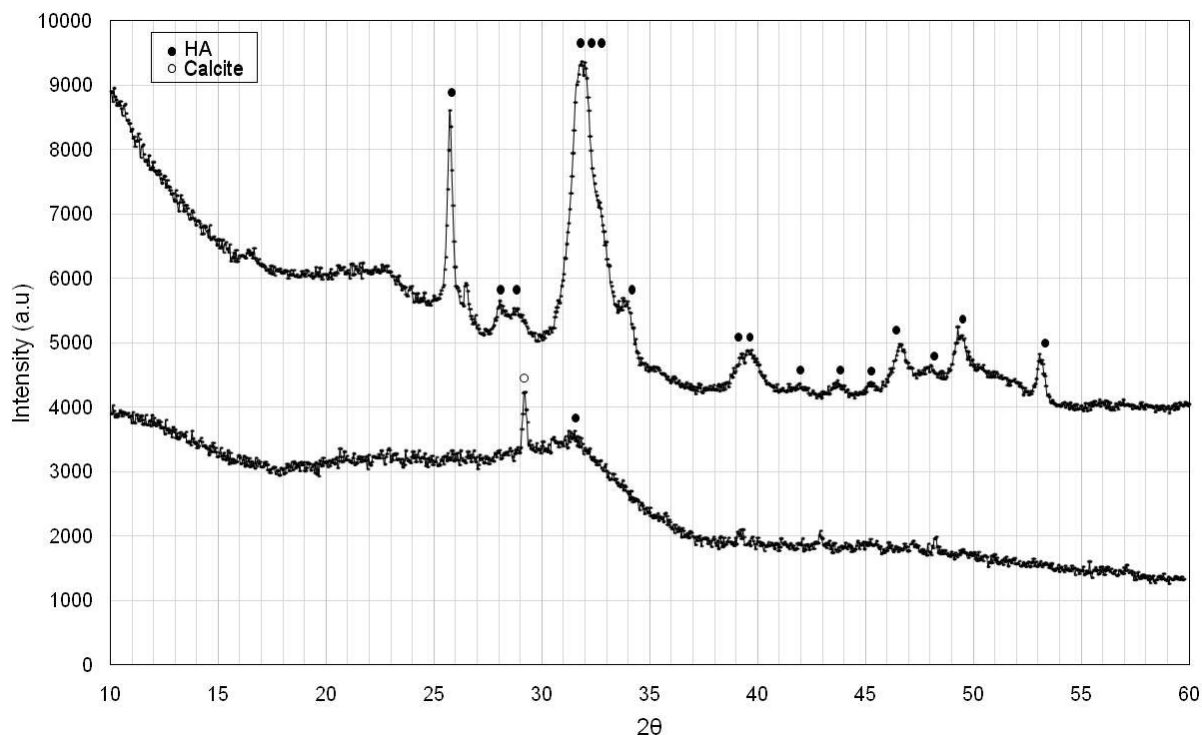


Figure 5: XRD patterns of the Bioglass® particles after 17 hours (lower curve) and 28 days (upper curve) in SBF (● HA JCPDS 9-432, ○ calcite JCPDS 86-2334).

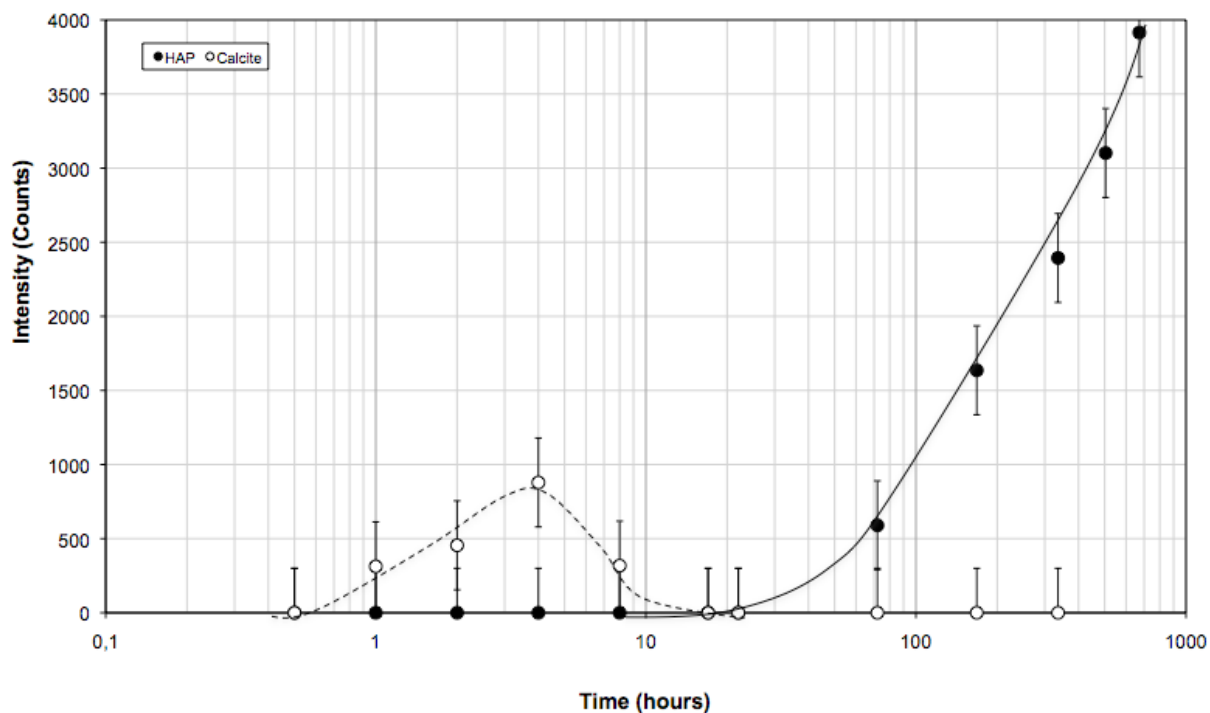


Figure (6): Intensity of (211) HA and (104) calcite peaks measured by XRD on Bioglass® particles versus immersion time.

b) Crystallization on the polymer and on the composites

---

The absence of any crystalline phase on the polymer was confirmed by XRD. In contrast, crystallization of both calcite and HA was observed on all the composites. The calcite and HA contents, however, depend strongly on the composition of the composite and on immersion time.

Figure 7 and figure 8 present the results obtained for C20. Figure 7 shows the presence of both calcite and HA after 7 or 56 days, but their ratio is different: the longer the immersion time, the larger the HA to calcite ratio. This is evidenced in figure 8, which shows the evolution of the intensity of the major peak of calcite (104) and of HA (211) versus time. In contrast to Bioglass® particles alone, there is no decrease of the calcite (104) peak when HA begins to crystallize. This is explained by the slow, isolated crystallization of HA that does not cover calcite.

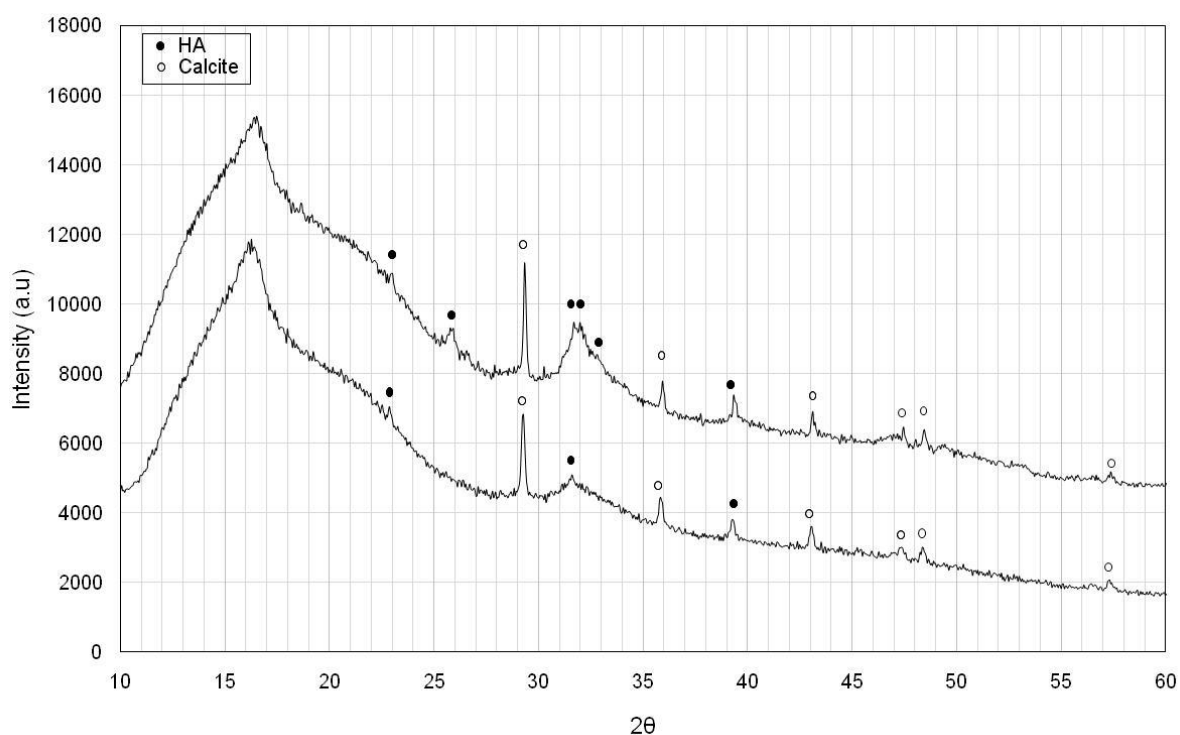


Figure 7: XRD patterns of the C20 composite after 7 days (lower curve) and 56 days (upper curve) in SBF.



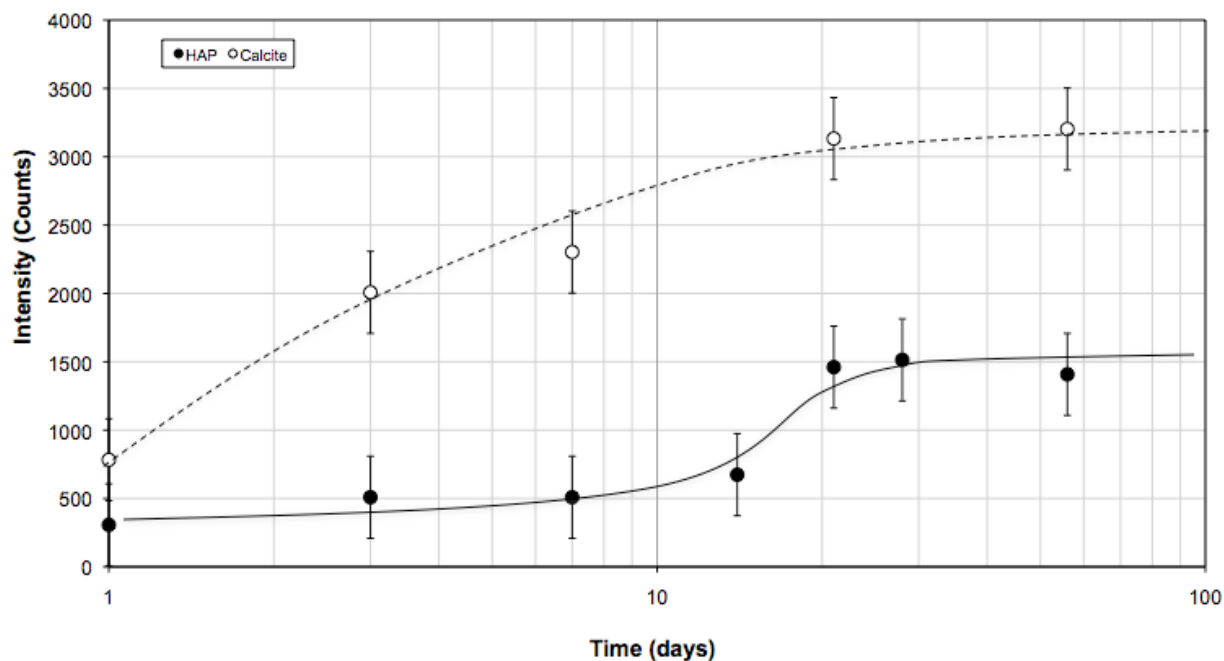


Figure (8): Intensity of (211) HA and (104) calcite peaks measured by XRD on C20 composite versus immersion time.

Figure 9 and figure 10 present the results obtained for C30. It is to note that the intensities of both calcite and HA peaks were larger as compared to C20, which traduces a larger crystallization activity on C30. Calcite is the major phase at 7 days, while HA was predominant at 56 days (fig. 9). This is traduced in Figure 10: The intensity of the (104) calcite peak increases up to 21 days, then decreases simultaneously with an increase of the HA (211) peak. As for Bioglass® particles alone (but with a slower rate), this is explained by a crystallisation of calcite during a first stage, followed by a predominant crystallisation of HA that covers calcite crystals.

XRD diffractograms are not presented for C50 in order to save space. However, in agreement with optical and SEM observations, HA was the predominant phase even at short durations. Some calcite was present at short times, but quickly covered by HA crystals.

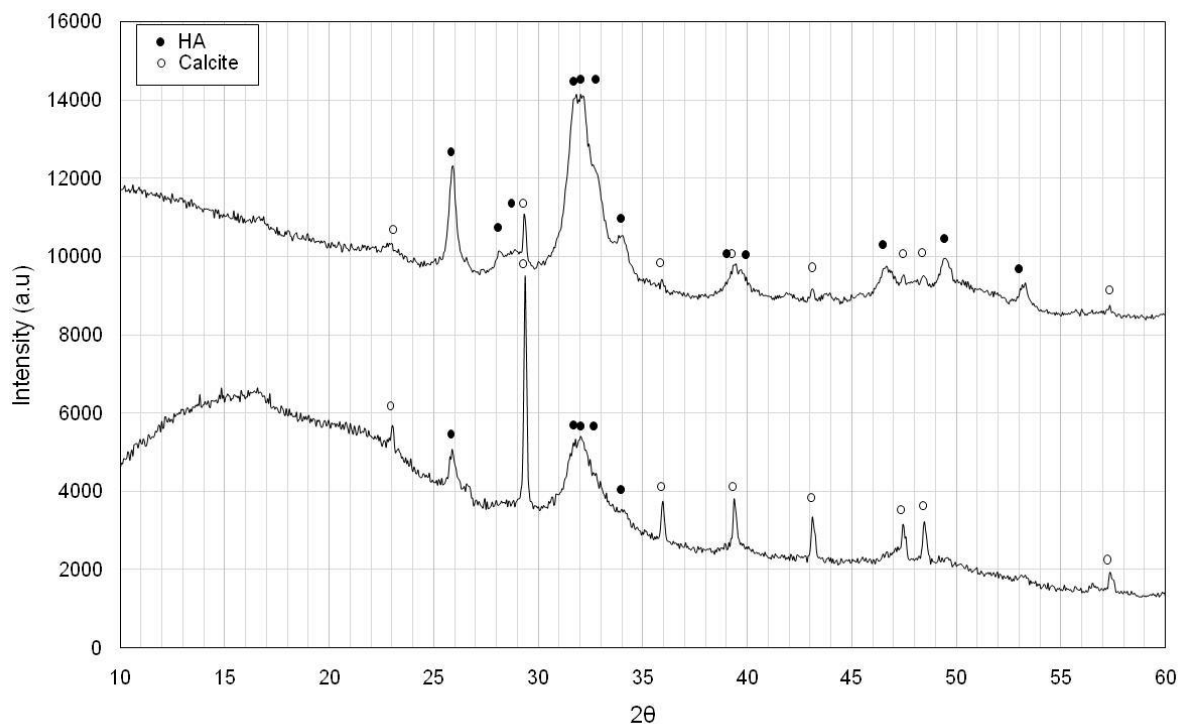


Figure 9: XRD patterns of the C30 composite after 7 days (lower curve) and 56 days (upper curve) in SBF.

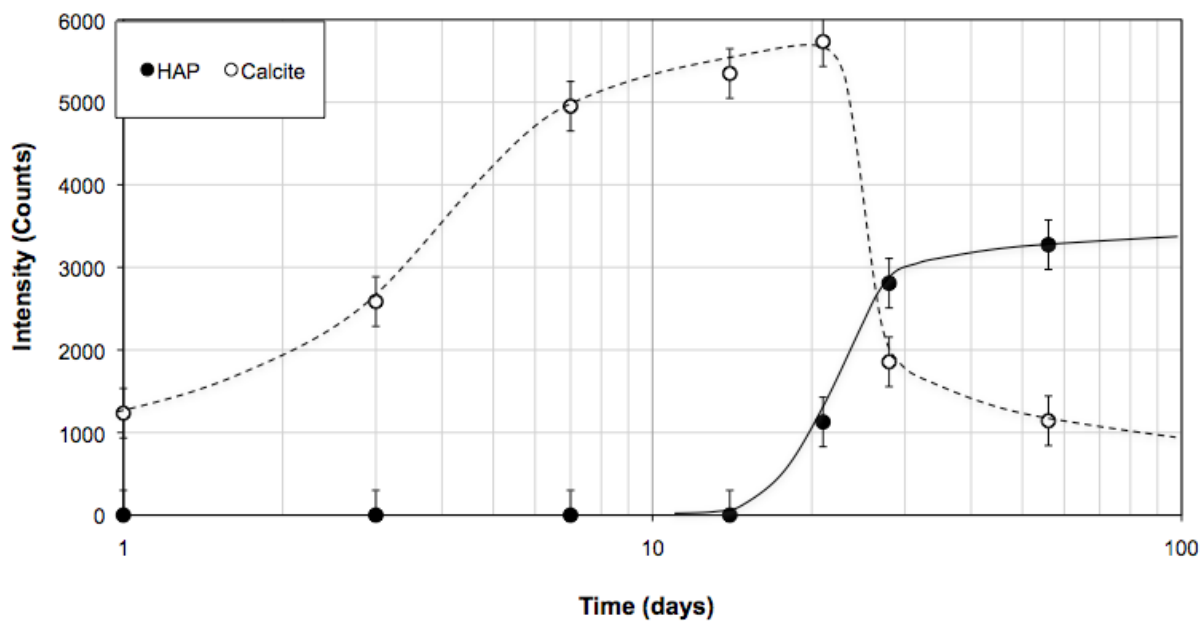


Figure (10): Intensity of (211) HA and (104) calcite peaks measured by XRD on C30 composite versus immersion time.

c) Rietveld analysis

Rietveld analysis was performed with the objective of quantifying the relative content and the size of HA and calcite crystals. Figure 11 represents the evolution of the HA content (precisely the HA content inside the crystallised layer) versus time for the three composites. HA content is very difficult to quantify for small duration (large peak with a very weak intensity). HA becomes the major phase for C50 after 3 days only and 14 days for C20 and C30. Rietveld analysis gives additional information on the relative content of HA at the surface: the content of HA reaches about 95% after only 3 days in C50, 90% in C30 after 21 days, 80% in C20 after 21 days. HA is therefore the major phase at the surface of all composites when SBF soaking is long enough.

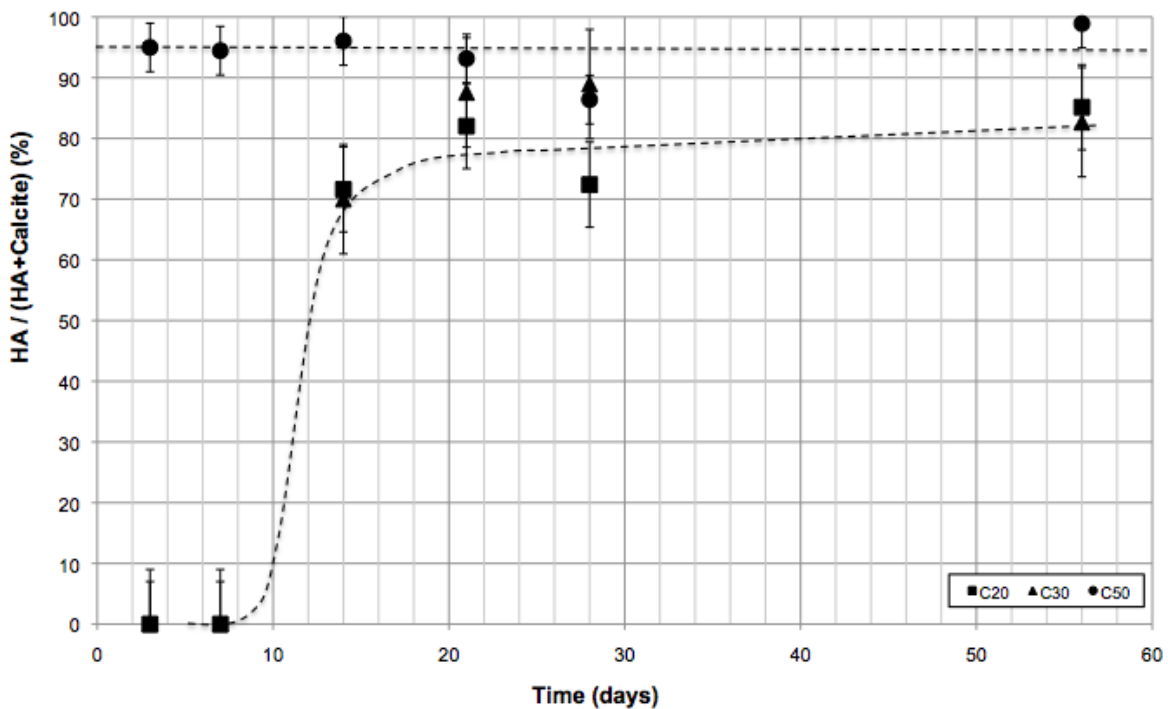


Figure 11: HA percent of the crystallized layer versus immersion time on the composites, determined by Rietveld analysis.

Figure 12 summarizes the whole set of data obtained for the HA and calcite crystal sizes. HA crystal size is one order of magnitude lower than that of calcite (resp. 10 nm and 100 nm). The size is almost constant with immersion time, even if a small increase is noticed for the first 7 days. Crystallisation occurs mainly by nucleation of new crystals with time, but their size remains roughly constant. These results explain the peak morphology: peaks are very intense and thin for calcite ('large' crystals but in fact in small quantity) and broad for HA (very small crystal but in fact in large quantity). This is consistent with all SEM observations: calcite crystals observed by SEM were needle like crystal of several microns length and less than one micron in diameter. HA crystals were much more smaller in dimension.

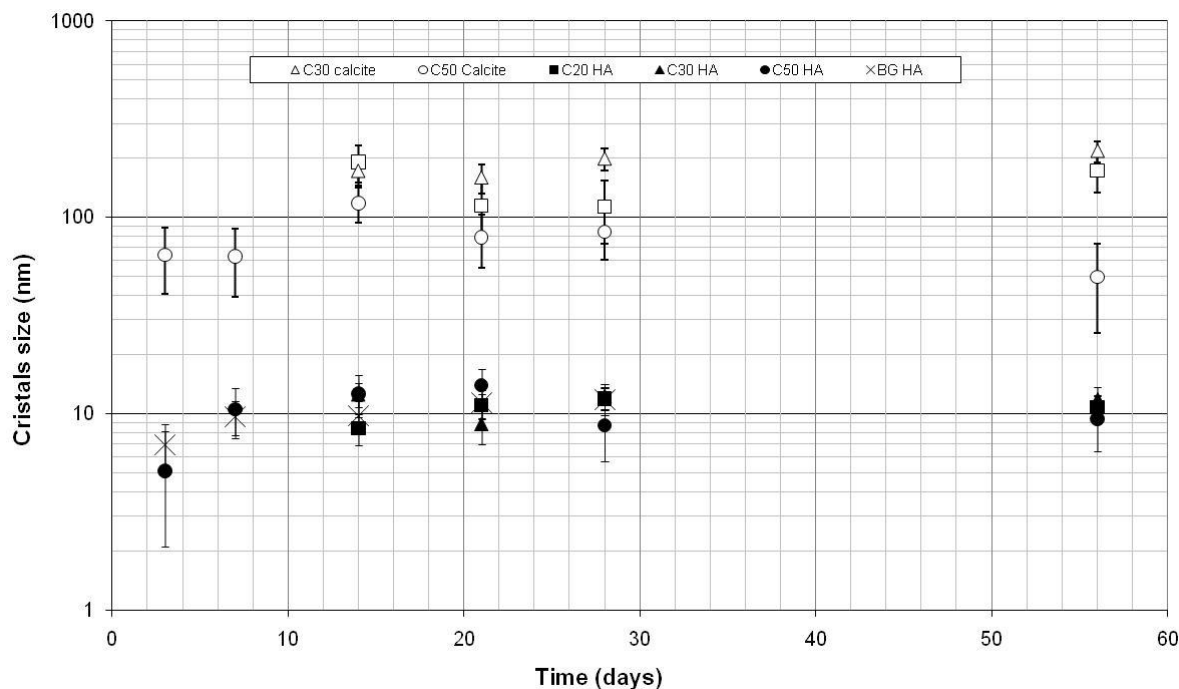


Figure 12: HA and calcite crystals size versus immersion time on the bioglass (BG) and the composites, determined by Rietveld analysis.

## C.IV. DISCUSSION

The overall set of data and observations allows for the first time to give a general feature of the crystallisation process occurring at the surface of PDLLA-Bioglass® composites. The crystallization processes and their relative kinetics as a function of Bioglass® content in the composite are schematically described in figure 13. In all composites, and even on Bioglass® particles themselves, we show a crystallisation of elongated calcite crystals particularly at short times. The presence of calcite at the surface of PDLLA-Bioglass® was not reported before. However, some authors have previously observed calcite formation on 45S5 Bioglass®, especially when the concentration in SBF was high<sup>29-31</sup>. Jones et al.<sup>30</sup> observed CaCO<sub>3</sub> for a concentration of Bioglass® particles in SBF higher than 2 mg/ml at a pH = 7.25. This is consistent with our results, since the concentration of Bioglass® per unit volume of solution ranged between 2.9 to 8.4 mg/ml and the pH between 7.2 and 7.4. CaCO<sub>3</sub> crystallisation is attributed to a large content of calcium released by Bioglass® during the first stage of immersion, leading to an excess of calcium in the solution. It may be that calcium diffusion occurs from particles inside the composite, through the polymer network. This excess of calcium promotes the formation of CaCO<sub>3</sub> at least during the first stages of the crystallisation, as described in figure 13. In the case of Bioglass® particles in solution, Jones et al. suggested that CaCO<sub>3</sub> crystallised at the expense of HA and induced a decrease of bioactivity. Our results tend to show that CaCO<sub>3</sub> and HA formations are two parallel paths for crystallisation, with different kinetics but that the presence of CaCO<sub>3</sub> does not hinder HA precipitation (bioactivity) in such composites. However, even if we privilege the concurrent crystallisation of CaCO<sub>3</sub> and HA, we cannot exclude that dissolution-reprecipitation of one or the two phases occurs in a dynamic process in the range of pH investigated. On a practical

point of view, the relative amount of HA in the crystallisation layer at the surface was always larger than 80% at 21 days, whatever the amount of Bioglass® in the composite. The crystallisation kinetics are strongly dependent on the Bioglass® content in the composites. For C20, CaCO<sub>3</sub> and HA crystallisation rates are very low, and the surface hardly covered with isolated crystals, even for long immersion time (see fig. 13). On the other side, C30 and C50 composites lead to a thick HA layer after 28 days or 3 days respectively, giving optimal conditions for bioactivity. The present results unfortunately show that the polymer matrix in the C50 composite degrades rapidly, as shown by the strong weight loss and the visual aspect after 3-7 days only. This degradation is traduced by crack propagation and chipping as schematized in figure 13. In a recent paper, Blaker et al.<sup>32</sup> have shown a premature degradation of PDLLA processed by co-extrusion and subsequent compression moulding in the presence of Bioglass® particles. The degradation was attributed to a significant reduction of the polymer molecular weight due to the combined effect of high temperature processing and the presence of Bioglass® particles which promotes chain scission by Si-O<sup>-</sup>. The degradation was the highest for the largest Bioglass® content, i.e. 40 wt.%. C30 therefore appears to give the best balance between bioactivity and stability at least during the first weeks of immersion in contact with body fluids. Further studies are in progress to follow the degradation kinetics of C30 composites *in vitro* and *in vivo*, for longer durations (up to 6 months). It is to note that no specific test was performed in this work to quantify the adhesion of the crystalline layer to the composite. Such tests would give an idea on the applicability of such composites for bone repair applications, since adhesion of the crystallised layer is necessary to favour bone apposition and avoid micro motions. This could be the subject of future work. Another limit of the current work is that crystallisation and degradation processes have been conducted in a particular environment (SBF, under static conditions and with a change of the solution twice a week). It is clear that SBF ions contribute to the building up of the surface crystals and that the sequences by which Calcite and HAP nucleate certainly strongly depend on testing conditions<sup>33</sup>. This is also certainly the case for PLLA degradation. Further work is in progress to follow such crystallisation-degradation processes *in vitro* with different testing conditions and *in vivo*.

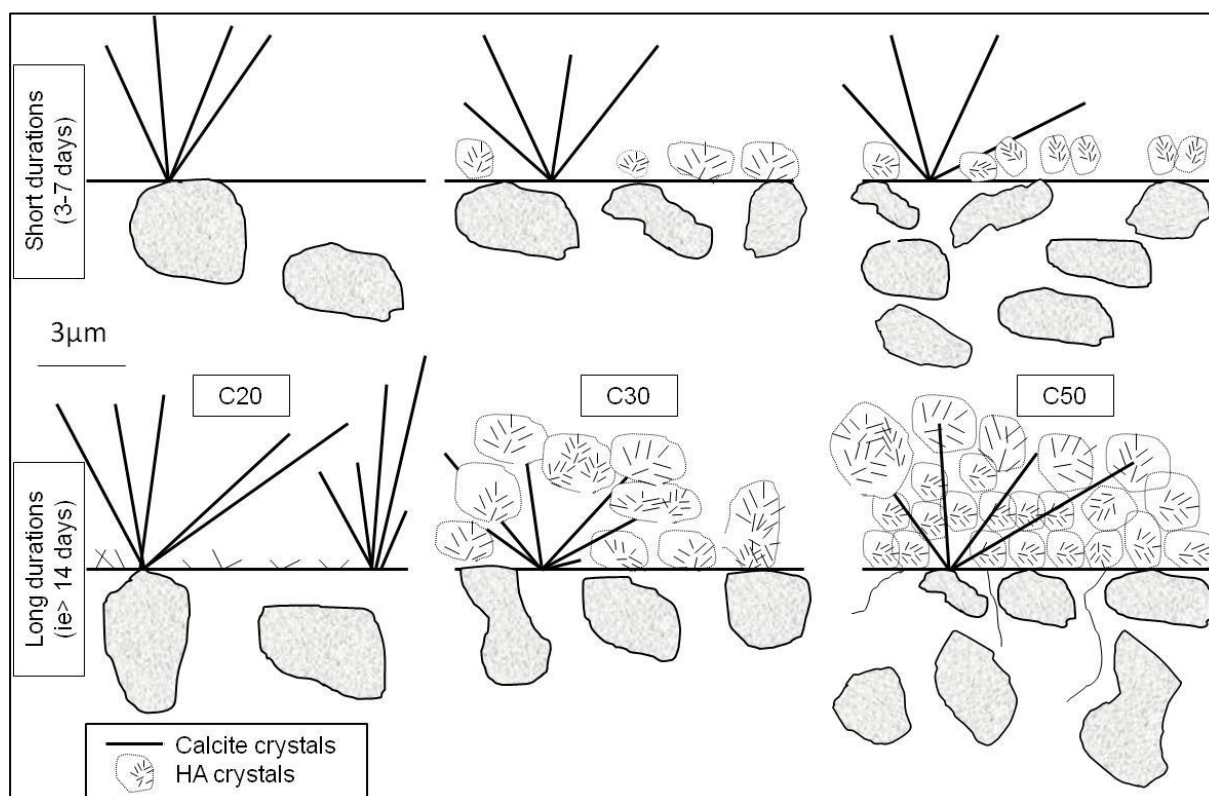


Figure 13: Scenario of crystallization of calcite and HA on the composites for short and long durations.

## C.V. CONCLUSION

Injection moulding was used to manufacture PDLLA-Bioglass® composites containing different amounts (0, 20, 30 and 50wt%) of 45S5 bioglass® particles, in order to assess their bioactivity.

Although the presence of calcite was observed for small immersion time in SBF, HA was always the major phase at the surface of the composites after three weeks. The crystallisation kinetics were slower than that observed for Bioglass® particles alone, but thick HA layers were observed at the surface of the composites after 3 days or 4 weeks of immersion in SBF, when the Bioglass® content was equal to 50 wt.% or 30.wt.% respectively. A large Bioglass® content favours rapid HA crystallisation at the surface on one hand, but also leads to a rapid degradation of the composite as shown for 50 wt.% Bioglass® particle content. Therefore, composites with 30 wt.% of Bioglass® particles seem to exhibit the best balance between bioactivity and stability at least during the first weeks of immersion in contact with body fluids. Such organic-inorganic composites, processed with conventional manufacturing techniques such as injection moulding are promising candidates to process complex-shape components with tailored bioactivity and resorption rate. The choice of the Bioglass® content will be dictated by the specifications of the device, and in particular its degradation rate.

## References

1. Ambrose CG, Clanton TO. Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering* 2004, 32:171-177.
2. Griffith LG. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia* 2000, 48:263-277.
3. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2005, 32:762-798.
4. Mainil-Varlet P, Rahn B, Gogolewski S. Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides : 1. One-year results. *Biomaterials* 1997, 18:257-266.
5. Moser R, C., McManus AJ, Riley SL, Thomas KA. Strength retention of 70:30 poly(L-lactide-co-D,L-lactide) following real-time aging. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005, 75B:56-63.
6. Peltoniemi H, Ashammakhi N, Kontio R, Waris T, Salo A, Lindqvist C, Grätz K, Suuronen R. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 2002, 94:5-14.
7. Middleton JCM, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000, 21:2335-2346.
8. Schwach G, Vert M. In vitro and in vivo degradation of lactic acid-based interference screws used in cruciate ligament reconstruction. *International Journal of Biological Macromolecules* 1999, 25:283-291.
9. Pihlajamäki H, Bostman O, Hirvensalo E, Tormala P, Rokkanen P. Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 1992, 74:853-857.
10. Vaccaro AR, Singh K, Haid R, Kitchel S, Wuisman P, Taylor W, Branch C, Garfin S. The use of bioabsorbable implants in the spine. *The Spine Journal* 2003, 3:227-237.
11. Rokkanen PU, Böstman O, Hirvensalo E, Mäkelä EA, Partio EK, Päätiälä H, Vainionpää S, Kimmo V, Törmälä P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials* 2000, 21:2607-2613.
12. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Närhi T, Yli-Urpo A, Seppälä J. In vitro evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2002, 23:2143-2150.
13. Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Barrias CC, Barbosa MA. In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:411-419.
14. Niemelä T, Niiranen H, Kellomäki M, Törmälä P. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I: Initial mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:235-242.
15. Zhou Z-h, Ruan J-m, Zhou Z-c, Shen X-j. Bioactivity of bioresorbable composite based on bioactive glass and poly-L-lactide. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2007, 17:394-399.
16. Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Närhi T, Jokinen M, Seppälä J, Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* 2004, 25:575-581.
17. Leonor IB, Sousa RA, Cunha AM, Reis RL, Zhong ZP, Greenspan DC. Novel starch thermoplastic/Bioglass composites : Mechanical properties, degradation, behavior in-vitro bioactivity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002, 13:939-945.
18. Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006, 17:967-978.
19. Hench L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1998, 81:1705-1728.

20. Lu HH, Tang A, Oh SC, Spalazzi JP, Dionisio K. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 2005, 26:6323-6334.
21. Zenati R, Pacard E. Method for preparing a composite material, resulting material and use thereof. Patent WO/2008/116984. 2 Octobre 2008.
22. ISO. Implants for surgery - in vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials. *ISO 23317 2007*, 13 p.
23. Lukito D, Xue JM, Wang J. In vitro bioactivity assessment of 70 (wt.%)SiO<sub>2</sub>-30 (wt.%)CaO bioactive glasses in simulated body fluid. *Materials Letters* 2005, 59:3267-3271.
24. Mami M, Lucas-Girot A, Oudadesse H, Dorbez-Sridi R, Mezahi F, Dietrich E. Investigation of the surface reactivity of a sol-gel derived glass in the ternary system SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Applied Surface Science* 2008, 254:7386-7393.
25. Rehman I, Knowles JC, Bonfield W. Analysis of *in vitro* reaction layers formed on Bioglass® using thin-film X-ray diffraction and ATR-FTIR microspectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998, 41:162-166.
26. Kontonasaki E, Zorba T, Papadopoulou L, Pavlidou E, Chatzistavrou X, Paraskevopoulos K, Koidis P. Hydroxy Carbonate Apatite Formation on Particulate Bioglass In Vitro as a Function of Time. *Crystal Research and Technology* 2002, 37:1165-1171.
27. Zhong JP, Greenspan DC, Feng JW. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002, 13:321-326.
28. Qiang M, Wang Y, Zheng H, Ning C, Chen X. Influence of pH Value Stability on the Biomineralization of Bioglass. *Materials Science Forum* 2009, 610-613:1387-1390.
29. Cerruti M, Greenspan D, Powers K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. *Biomaterials* 2005, 26:1665-1674.
30. Jones JR, Sepulveda P, Hench LL. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, 58:720-726.
31. Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Aina V, Morterra C. Fluoride-containing bioactive glasses: Surface reactivity in simulated body fluids solutions. *ActaBiomaterialia* 2009, 5:3548-3562.
32. Blaker JJ, Bismarck A, Boccaccini AR, Young AM, Nazhat SN. Premature degradation of poly( $\alpha$ -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites. *ActaBiomaterialia* 2009, 6:756-762.
33. Bohner M, Lemaitre J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 2009, 30:2175-79.



## Chapter D

### D.ARTICLE 3

## Correlation between *in vitro* and *in vivo* characterization of a PDLLA/Bioglass® composite

<b>D.I. Introduction</b>	<b>119</b>
<b>D.II. Materials and methods</b>	<b>120</b>
D.II.1 Polymer and composite materials	120
D.II.2 In vitro degradation	120
D.II.3 Cytocompatibility	123
D.II.4 Biocompatibility in vivo	123
<b>D.III. Results</b>	<b>128</b>
D.III.1 Degradation in vitro	128
D.III.2 Cytocompatibility in vitro	133
D.III.3 Biocompatibility in vivo	134
<b>D.IV. Discussion</b>	<b>140</b>
D.IV.1 Impact of sterilization on the polymer matrix molecular weight	140
D.IV.2 Acceleration of polymer matrix degradation in vitro with addition of Bioglass® particles	141
D.IV.3 Cytocompatibility in vitro of the P(L,DL)LA/Bioglass® composite	142
D.IV.4 In vivo biocompatibility of the composite and acceleration of bone growth	143
D.IV.5 Comparison between in vitro and in vivo degradation	144
<b>D.V. Conclusion</b>	<b>144</b>

L'étude de dégradation d'un matériau *in vitro* dans un fluide physiologique permet d'avoir une estimation de la cinétique de résorption de ce matériau *in vivo*. Une étude de culture de cellules *in vitro* permet de déterminer la cytotoxicité d'un matériau. Cependant ces évaluations *in vitro* présentent des limites quant aux prédictions que l'on serait tenté de faire sur le comportement *in vivo* des matériaux. Les contraintes auxquelles le matériau est soumis *in vitro* et *in vivo* n'étant pas similaires, dans quelle mesure cette extrapolation est-elle valable ? Le matériau étudié peut-il engendrer indirectement un biais à l'analyse quand celui-ci est responsable d'un relargage important d'ions alcalins ? Nous tentons dans cette dernière partie de répondre à ces différentes questions via une comparaison des observations faites *in vitro* à celles faites *in vivo* par implantation musculaire et osseuse chez le lapin.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the ability of a P(L,DL)LA/Bioglass® 45S5 (30 wt%) composite to be used as a bone fixation device. Poly( $\alpha$ -hydroxy acids) and in particular poly(lactic acid) are nowadays among the most used bioabsorbable materials. However bioresorbable polymers do not facilitate bone growth and may have inadequate degradation characteristics. To overcome these limitations, research is today focused on organic-inorganic composites. Indeed, addition of a bioactive mineral phase to the polymer matrix promotes bone growth at surface of the material and can reduce the degradation time of the polymer. The aim of this work was to confirm these two effects of the Bioglass®: on the kinetics degradation and on the osteointegration properties. Impact of the Bioglass® on the degradation kinetics of the polymer matrix was therefore studied *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* degradation study was performed by immersion of polymer and composite in a phosphate-buffered saline (PBS) during 6 months. Before any implantation study, a previous estimation of the cytotoxicity of the material was carried out *in vitro*. Osteoblastic cell cultures were therefore performed on both materials. Finally implantation was performed for two objectives: (a) to compare *in vitro* and *in vivo* degradation behaviors; (b) to observe *in vivo* improvement of the osteointegration with the addition of Bioglass®. Intramuscular and intraosseous implantations were conducted in rabbits during 6 months. Muscular implantation allowed evaluating the reaction of the implant in another tissue than the functional tissue, but also observing the potential osteoinductive properties of the composite. Results showed that incorporation of Bioglass® particles into the polymer matrix significantly accelerated degradation of the polymer *in vitro*. *In vivo* testing led to different results. Indeed after 6 months of immersion *in vitro*, the composite showed important signs of degradation, whereas *in vivo* it was not degraded or presented very minor signs of degradation. Cellular proliferation revealed a similar proliferation on both materials, addition of Bioglass® *in vitro* did not seem to stimulate cellular proliferation. However *in vivo*, addition of Bioglass® in the polymer matrix seemed to accelerate bone osteointegration and above all during the first month of implantation. This study highlights that some precautions have to be taken when *in vitro* testing is used to predict *in vivo* behavior of materials.

## D.I. INTRODUCTION

Over the past two decades, bioabsorbable devices have been used and experimented in many fields of the orthopedic surgery, including fixation of fractures and bone replacement. They are currently used as pins, plates and screws for orthopedic, oral and craniofacial surgery. These materials present several advantages compared with their metal counterparts. Indeed their bioresorbability avoids a second operation to remove the implant and their stiffness closer to bone avoids stress-shielding phenomenon. Moreover radiopacity of polymers facilitates also the medical follow-up of the patient. Last their bioresorbability limits risks of fibrous capsule formation and inflammation often observed with permanent implants. However they present some drawbacks such as an inadequate degradation rate and an inability to fully integrate to bone. Some crystalline polymers such as the poly(lactic acid) (PLLA) for example need more than 4 years to degrade<sup>1</sup>. A strategy to improve their osteointegration capacity has been to fill a polymer matrix with a bioactive ceramic such as hydroxyapatite or tricalcium phosphate. Bioactive ceramics promote better bone bonding due to the formation of a surface calcium phosphate layer after immersion in body fluids. Various authors have already reported biocompatibility of HA-PLLA composites<sup>2-8</sup>. Verheyen et al.<sup>9</sup> have observed by histological analysis an increase of the bone contact on the PLLA/HA composite compared to PLLA alone. Recently, much attention has been focused on composites filled with bioactive glass particles. Bioglass® 45S5 has been well studied<sup>10</sup>, and it is known to be the most bioactive bioglass<sup>11</sup>.

The control of the degradation rate of the polymer is important; it has to be adapted to the implantation site requirements. Poly(lactic acid) degradation is a complex process that has been extensively investigated<sup>12-17</sup>. It is known that numerous parameters can affect the polymer degradation mechanism such as crystallinity, molecular weight, processing conditions, size and shape of the specimens. Addition of an inorganic phase into the polymer matrix increases the complexity of the polymer degradation mechanism. When bioactive glass reacts with body fluids, a local alkaline environment is created, due to the bioactive glass salting-out. It has been reported to neutralize lactic acid and slow down the polymer degradation<sup>18</sup>. Indeed it was observed, on composite scaffolds, that the presence of Bioglass® slew down molecular weight reduction compare to the neat polymer<sup>18, 19</sup>. Different results were observed on dense composites. Rich et al.<sup>20</sup> observed a faster reduction of molecular weight with the addition of bioactive glass S53P4 (50 to 60wt.%) into a P(CL/DL-LA) matrix. Navarro et al.<sup>21</sup> observed a double decrease of the molecular weight of the PLDLLA/G5 (50 wt.%) composite after 2 weeks, but this tendency was inversed after 6 weeks. This behavior was attributed to the buffering effect caused by the degradation products of the bioactive glass, which even if not basic, are less acidic than the degradation products of the polymer. But concerning water absorption and weight loss, all studies reported that presence of bioactive glass increased them as compared to neat polymer. This initial rapid weight loss on the composite was attributed to the dissolution of the bioactive glass. These results were observed on scaffold of PLGA/Bioglass®<sup>18</sup> or P(D,L)LA/Bioglass®<sup>19</sup> as well as on dense composites<sup>20-22</sup>. All the studies seem to show that addition of bioactive glass particles accelerates polymer matrix degradation, but the molecular weight reduction profile may depend on the balance between the autocatalytic degradation catalyzed by carboxyl end groups and the buffering effect of the bioactive glass.

We proposed, in the present work, to characterize the *in vitro* and *in vivo* P(L,DL)LA/Bioglass® composite behavior. Materials used for bone reparation devices have to be biocompatible, to promote bone growth, to degrade with a time that matches bone growth and with minimal inflammatory reaction. Therefore in order to determine the degradation kinetics of the composite, degradation behavior of the composite was first analyzed *in vitro*, by monitoring several physical and mechanical parameters. Then *in vitro* behavior was compared with *in vivo* behavior, after implantation in the femur condyle of rabbits. The second aim of this work was to study biocompatibility of the composite. It was first checked *in vitro*, by cells culture on the materials. And finally biocompatibility and osteoconductive properties of the composite *in vivo* were assessed with intramuscular and intraosseous implantations studies.

## D.II. MATERIALS AND METHODS

---

### D.II.1 Polymer and composite materials

A poly(L,DL)lactide (PDLLA) with a 70L/30DL ratio and an inherent viscosity between 5.7 and 6.5 dl/g was supplied by Boehringer Ingelheim, Germany (Resomer® LR708). 45S5 Bioglass® particles were obtained from high purity SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub> and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> powders. The powders were weighted, mixed and melted in a Pt crucible for 4h at 1400°C with a de-carbonation step (5h at 950°C). The melt was then quenched in water and ground in ethanol to a fine powder (particle size distribution of 3-4 µm). Composite granules with 30 wt.% of Bioglass® particles were processed following a protocol patented (Patent WO2008116984 (A2))<sup>23</sup>. Briefly, Bioglass® particles were first put in suspension in a solvent, then polymer was added and mixed to reach the desired bioactive glass/polymer ratio. The suspension was then precipitated in water. The precipitate was milled and sieved to obtain granules of mean diameter 1 mm. Polymer and composite granules were injection moulded into plates or cylinders.

---

### D.II.2 In vitro degradation

*In vitro* degradation of samples (cylinders of 12 x 6 mm<sup>2</sup>, sterilized by gamma irradiation at a minimum dose of 25 kGy) was assessed according to the standard ISO 15814. 36 samples were immersed individually in test tubes with 17 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 37°C for 14 days up to 6 months under static conditions. The pH of the solution was monitored in order to maintain a pH around 7.4. Every 14 days, 3 specimens were removed from the solution and analyzed.

Different parameters were followed:

- Water absorption and weight loss;
- Morphology by computed tomography;
- Compressive strength;

- Inherent viscosity;
- Molecular weight.

The following figure (Figure 1) synthesizes the different analyses performed during the 6 months of immersion in PBS. Table 1 summarizes the number of specimens tested at each immersion time and for each type of measurement.

All the *in vitro* experiments were conducted on sterilized specimens in order to compare with the same material tested *in vivo*.

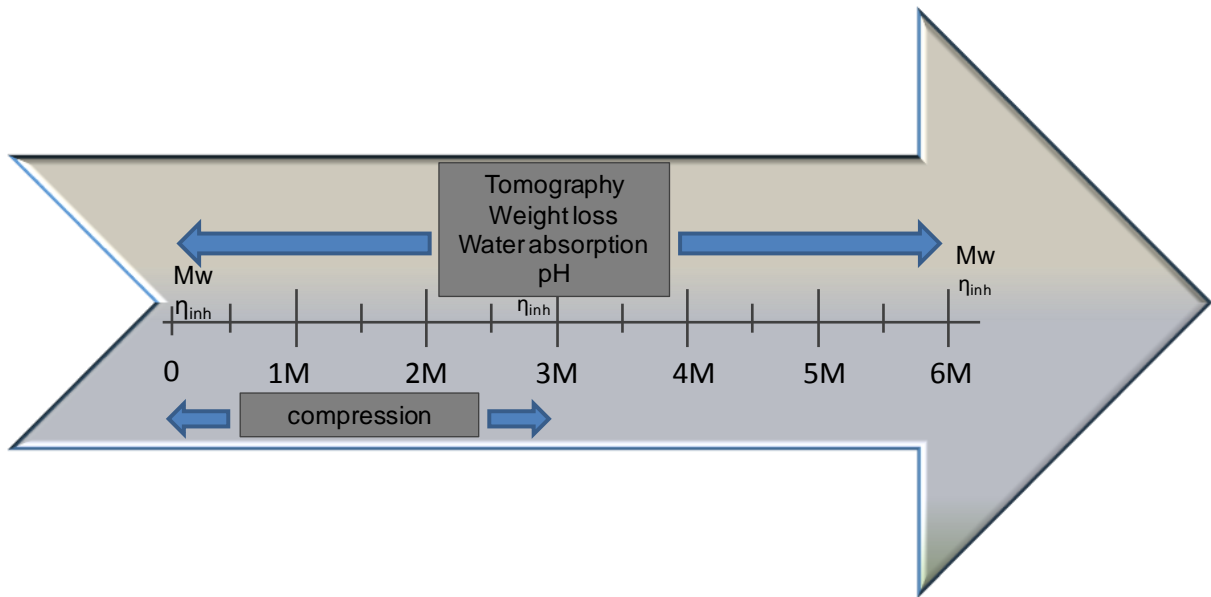


Figure 1: Schematic feature of the different measurements conducted on the polymer and the composite specimens during immersion in PBS for 6 months.

Measurement	Number of specimens tested at each time
Water absorption	3
Weight loss	3
Tomography-X	1
Compression	3
Inherent viscosity	1
Molecular weight	1

Table 1: Number of specimens tested at each immersion time.

#### a) Water absorption and weight loss

Every 14 days, water absorption and weight loss were measured on three specimens of each material.

After being removed from the solution, specimens were weighted (wet weight), rinsed with deionized water, and vacuum-dried until weight stabilization (dry weight).

Water absorption was determined using the following equation:

$$\text{Waterabsorption}(\%) = \frac{W_{t,wet} - W_{t,dry}}{W_{t,dry}} \times 100$$

Where  $W_{t,wet}$  is the weight of the wet specimen at time  $t$  and  $W_{t,dry}$  is the weight of the dried specimen at time  $t$ .

The percentage of the weight loss was determined using the following equation:

$$\text{Weightloss}(\%) = \frac{W_o - W_{t,dry}}{W_o} \times 100$$

Where  $W_o$  is the initial weight of the specimen.

#### b) Computed Tomography

---

Every 14 days, one specimen of each material was observed by computed tomography, in order to follow their degradation.

A computed protocol was conducted on a tomograph (Vtomex, Phoenix x-ray, Germany) with the following scanning parameters: source voltage: 70 kV, intensity: 240  $\mu$ A and resolution: 10  $\mu$ m.

#### c) Compressive test

---

Every 14 days, compressive tests were performed on an INSTRON 8502 machine on three specimens of each material, with a cross-head speed of 1 mm/min in agreement with NF EN ISO 604:2002.

#### d) Inherent viscosity

---

Viscosity tests were conducted on one specimen of each material before immersion and after 84 and 180 days of immersion in PBS.

Specimens were dissolved in chloroform (10mg/mL) and filtered (0.45  $\mu$ m) for inherent viscosity measurements. Inherent viscosity of the specimens was measured with a viscosimeter ViscoClock (Schott Instruments) equipped with a Julabo ME-16G bath.

### e) Molecular weight

---

Weight average molecular weight (Mw) measurements were performed on one specimen of each material before immersion and after 6 months of immersion in PBS.

Specimens were dissolved in chloroform (10 mg/mL) and filtered (0.45 µm) for molecular weight measurements. Molecular weights were obtained by size exclusion chromatography (SEC) with a PLgel 5 µm MIXED-C column (Polymer Laboratories) in chloroform at a flow rate of 0.5 mL/min using a multi-angle light scattering detector (miniDAWN™ TREOS) with a dn/dc value of 0.2.

---

## D.II.3 Cytocompatibility

Cell cultures were made on the polymer and the composite in order to determine the effect of the Bioglass® on the cell proliferation.

Specimens (10\*10\*2 mm<sup>3</sup>) were decontaminated by treatment in 70% ethanol for 15 min. They were then left 2 days in a sterile Petri dish under laminar air flow for ethanol evaporation.

A MG63 osteoblastic cell line, originally isolated from a human osteosarcoma (American Type Culture Collection) was used for these experiments. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) enrichment medium (supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) Mycokill antifungal, glutamine 1% (v/v), vitamin C and D).

A 100 µL drop of a suspension of the MG63 cells (3.10<sup>4</sup> cells/specimen) was added to each well of a 24-well culture plate and incubated in enrichment medium at 37°C in a carbon dioxide (5% CO<sub>2</sub>) incubator (Jouan CR3i, ThermoFisherScientific) in humidified air and for 3, 6 and 10 days. For each test, three wells without material were used as controls, and three specimens of each material type were tested. The culture medium was changed twice a week.

After 3, 6 and 10 days of culture, MTT test was performed on the materials to study the proliferation of the cells. At each time, all materials were incubated with 100 µl MTT ((3-{4,5-dimethylthiazol-2yl}-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide), Sigma Aldrich, 5 mg/mL in PBS X1) for 4 h at 37°C in the incubator. A 500 µL Ethanol/DMSO (v/v) solution was added onto specimens to solubilize formazan crystals formed inside the cells. Absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer (Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation).

---

## D.II.4 Biocompatibility in vivo

### a) Materials

---

Injection moulding was used to process rods with the following dimensions:

- Intramuscular implants: length: 10 mm and diameter: 2 mm;

- Intraosseous implants: length: 6 mm and diameter: 2 mm.  
Specimens were then sterilized by gamma irradiation at a minimum dose of 25kGy.

## b) Animal model and surgical technique

### Animal model

The study was carried out in agreement with the recommendations of the Ethical Committee of the Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Ethical Committee Guidelines, protocol agreement No. 0936/2009). Twenty-one healthy female New Zealand rabbits aged between 12 and 18 months and with a mean weight of  $4.6 \pm 0.3$  kg were used for this study. Three animal groups were distinguished versus implantation time: 1, 3 and 6 months, with 7 animals per group. For the 1 and 3 months groups, 4 specimens were implanted per rabbit: 2 intraosseous specimens and 2 intramuscular specimens (cf. Table 2). For the 6 months group, only 2 intraosseous specimens were implanted per rabbit.

Group (7 animals/group)	Bone implants		Muscular implants	
	Left lateral femoral condyle	Right lateral femoral condyle	Left dorsal muscular tissue	Right dorsal muscular tissue
1 month	1 Polymer	1 Composite	1 Polymer	1 Composite
3 months	1 Polymer	1 Composite	1 Polymer	1 Composite
6 months	1 Polymer	1 Composite		

Table 2 : Sites of implantation for each group.

### Preoperative treatment

Animals received preventive analgesia therapy by a subcutaneous injection of Buprenorphine (0.5 mg/kg, Temgesic, Pfizer, France) and preventive antibiotic therapy by injection of Trimethoprim 4% (v/w) and Sulfadiazine 20% (v/w) (20 mg/kg, Borgal, Intervet, Angers, France).

### Surgical procedure

Rabbits were first anesthetized by an intramuscular injection of ketamine (30 mg/kg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (2 mg/kg, Rompun 2% (v/w), Bayer HealthCare, Gaillard, France). Anesthesia for the surgical procedure was then maintained with a mixture of isoflurane in oxygen.

The back of the animals, as well as their legs, were shaved and scrubbed with antiseptic fluid (Vetidine soap and Vetidine solution, Vetoquinol, France). A lateral parapatellar arthrotomy was performed under sterile conditions. The patella was dislocated medially and the knee placed in full flexion. Cylindrical 2 x 6 mm osseous critical-sized defect were created in the left lateral femoral condyle and in the right lateral femoral condyle with a drill (drill 2.0 mm) from the antero-distal part of the femoral condyle to the posterior proximal direction (Fig. 2). These defects were then filled, via press fit, with the corresponding implant. Polymer and composite specimens were then implanted in the muscle, in left and right para-



lumbar regions respectively, after cutaneous and sub-cutaneous incisions. After implantation, the subcutaneous tissue and skin were closed in layers with resorbable sutures.

After all surgical procedures, the rabbits were allowed to wake up on a heated carpet. They were allowed free of activity in their cages. The animals were closely monitored for infections and other complications by a veterinarian everyday during the first week and then once per week.

### c) Euthanasia

---

Rabbits were euthanized after 1, 3 and 6 months by intracardiac injection of sodium pentobarbital euthanasia solution (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France).

### d) Implants retrieval

---

After euthanasia, the implants and the surrounding muscular tissue were retrieved and immersed in 70% ethanol. Femoral condyles were cut on bone diaphysis with a manual saw, dissected from any muscles or fibrous tissues, and kept at 7°C in gauze dipped in a saline solution, before computed tomography examination.

### e) Three-dimensional micro-Computed tomography observation

---

Computed tomography (CT) was used to non-destructively determine the extent of biodegradation and/or bone formation. It was performed on bone specimens within 24 hours after euthanasia. A computed protocol was conducted a tomograph (V|tome|x, Phoenix|x-ray, Germany) and defined with the following scanning parameters: source voltage: 60 kV, intensity: 260  $\mu$ A and resolution: 12  $\mu$ m. Bone tissue, having higher attenuation coefficient appeared in white, whereas soft tissues appeared dark.

Since tomographies were performed, specimens were rapidly immersed in 70% ethanol. Bone and soft tissues appeared with different grey levels due to different linear attenuation coefficients.

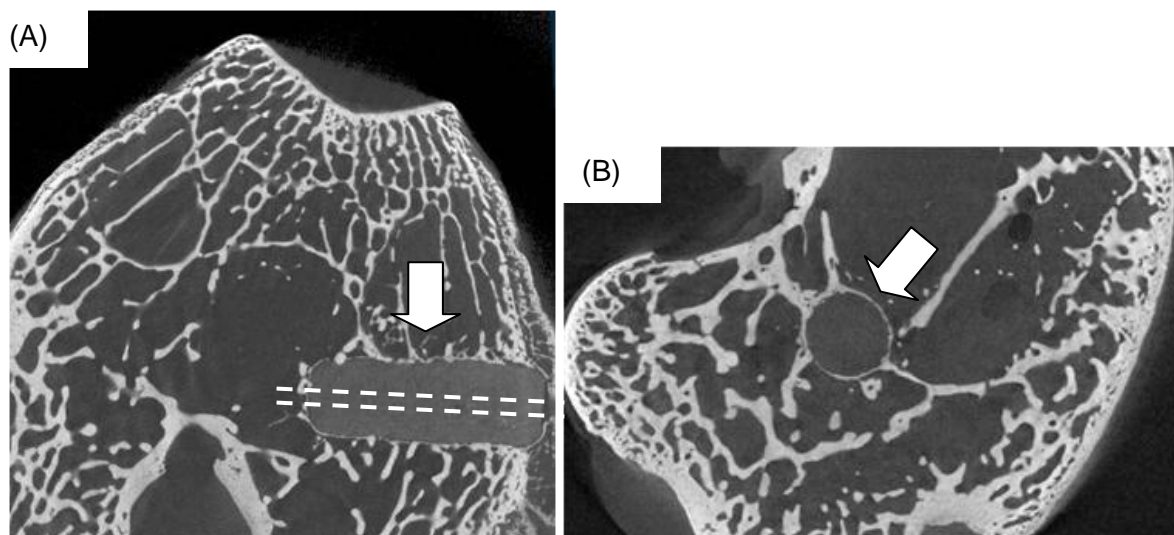


Figure 2: Image of polymer and composite implants in the lateral femoral condyle at 1 month after implantation. (A) Transversal plane of the condyle with the composite implant in the lateral right condyle. The central longitudinal slice cut for histological analysis is represented by dotted lines. (B) Sagittal plane of a condyle with a polymer implant in the lateral left condyle.

#### f) Histological analysis

##### Preparation of muscular slices

Muscular specimens were collected immediately after sacrifice and they were dehydrated through a series of graded ethanol (70 and 100°), soaked in methylcyclohexan to remove the alcohol and embedded in different solutions of methyl methacrylate (MMA). The protocol is presented in the Table 3, and described in details in the appendix (page 145).

Blocks were then cut in thin slices of 20  $\mu\text{m}$  with a microtome (Shandon Finesse, Thermo Scientific, USA), equipped with a tungsten blade and stained using the Masson-Goldner method.

	Muscular explants		Bone explants	
	Frequency	Time (days)	Frequency	Time (days)
Ethanol 70°	2	7	5	7
Ethanol 100°	2	3	2	3
Methylcyclohexan	1	2	1	2
MMA1	1	3	1	7
MMA2	1	3	1	7
MMA3 4°C	1	3	1	7
MMA3 30°C	1	7*	1	7*

Table 3: Protocol of dehydration and fixation of muscular and bone explants (\* minimal time).

### Semi-quantitative histopathological analysis of the muscular slices

These histological slices were then examined by light microscopy using a LEICA DM200 microscope. Biological reactions in surrounding tissue were examined in each specimen. Several parameters were analyzed (granuloma, eosinophil granulocytes, plasma cells, fibroblast/collagen and angiogenesis) and classified according to the following grading system based on their corresponding intensity:

- (0) Absence
- (1) Slight
- (2) Moderate
- (3) Marked

### Preparation of bone slices

After tomography, bone explants were cut transversally on both sides of the implant, using a low speed oscillating saw (Isomet, Buehler, Illinois, USA) equipped with a 15 HC diamond blade (10.2 x 0.3 mm<sup>2</sup>) (cf. Fig. 3).

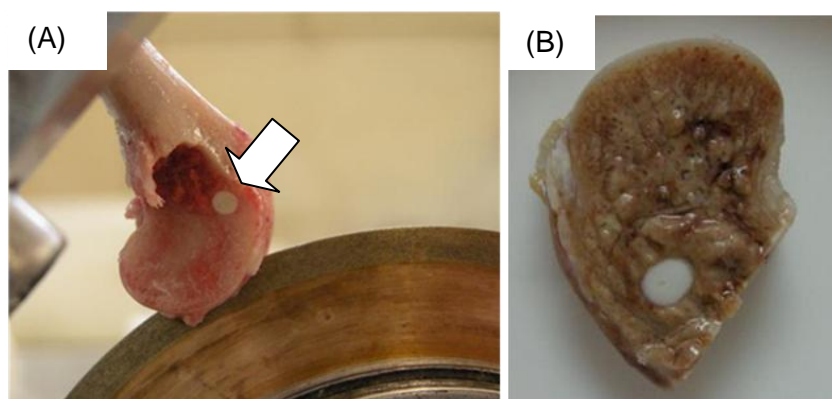


Figure 3: (A) Digital image of the transversal cutting of a lateral condyle with a diamond saw; (B) bone cut specimen obtained.

Bone specimens were then fixed and embedded following the same protocol as muscular specimens (Table 3). Histological slices were obtained by a microcutting and grinding technique adapted from Donath<sup>24</sup>. One central longitudinal slice per specimen was prepared (Fig. 2A) with a diamond wheel saw (Well 3241, ESCIL, Chassieu, France, diameter: 220 µm, grain size: 40 µm, length 10 m). These slices of 150 µm were then manually polished between two glass-slab with silicon carbide powder 180, 360 and 600 (ESCIL, Chassieu, France) until obtaining a thickness of approximately 105-110 µm.

### Semi-quantitative histopathological analysis of bone slices

Bone slices were then stained (Paragon staining) for histopathological examination (Biomatech SA, Chasse sur Rhône, France). The analysis was performed using a NIKON microscope Eclipse E600 coupled with a digital camera DN100 NIKON. Bone formation and biological reactions in surrounding tissue were examined in each specimen.

Several parameters (fibrin, necrosis, osteolysis, tissue degeneration, polymorphonuclear cells, lymphocytes, plasma cells, macrophages, giants cells/osteoclasts, soft tissue, newly formed bone, osteointegration, ostéoconduction, bone remodeling, neovascularization, material degradation) were followed and classified according to the following index:

- (0): absence
- (1): slight
- (3): moderate
- (4): marked
- (5): severe

### D.III. RESULTS

#### D.III.1 Degradation *in vitro*

##### pH evolution of PBS solution during immersion

Figure 4 shows the pH evolution of the PBS solution during experiment in presence of polymer and composite specimens. For the polymer, the pH of the solution did not change and stabilized between 7.5 and 7.7 during all the experiment. On the other hand, for the composite, the pH of the solution decreased slightly and reached 7.1 after 50 days of incubation. PBS solution was changed when pH was close to 7.0, i.e. after 78 and 162 days of immersion.

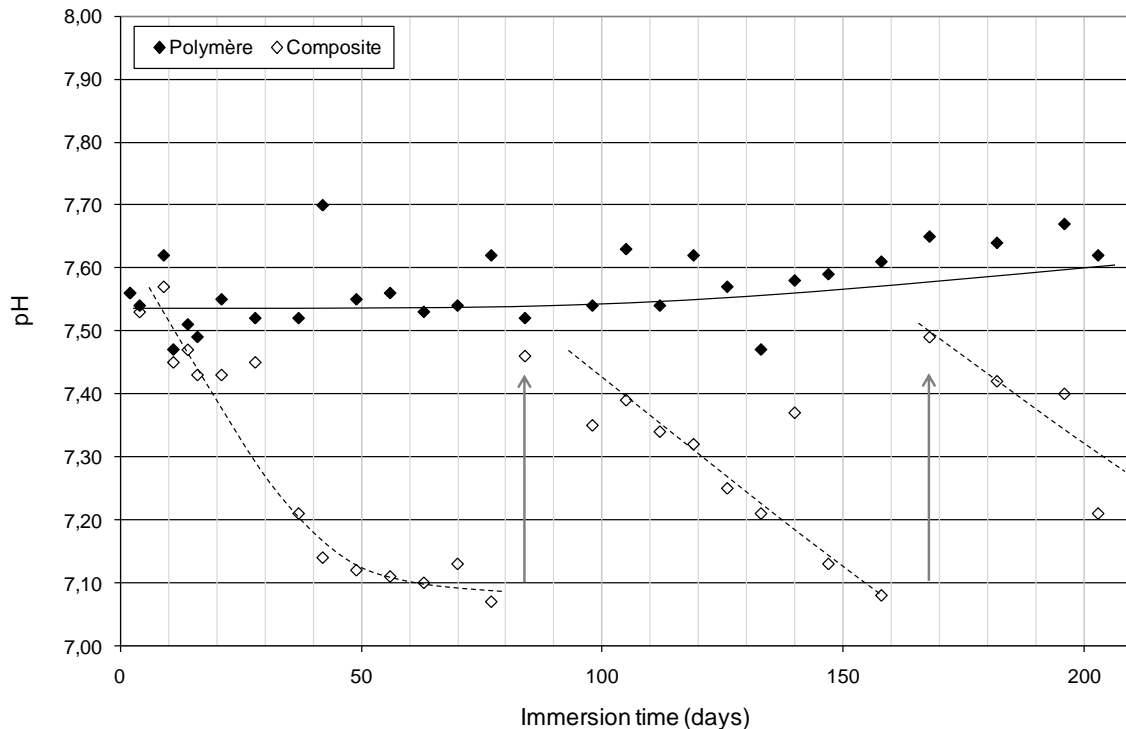


Figure 4: Evolution of PBS solution pH during immersion time (the arrows indicates solution changes).

##### In vitro weight loss

Figure 5 shows weight loss evolution in function of immersion time for both polymer and composite. Polymer weight was rather stable during the 6 months of immersion. On the other hand, composite weight loss increased progressively with time. From 15 days of immersion

the composite lost 15% of its initial weight. We noticed a slight acceleration of composite weight loss after each PBS change (i.e. after 78 and 162 days of immersion). After 6 months of immersion, the composite lost 35% of its initial weight.

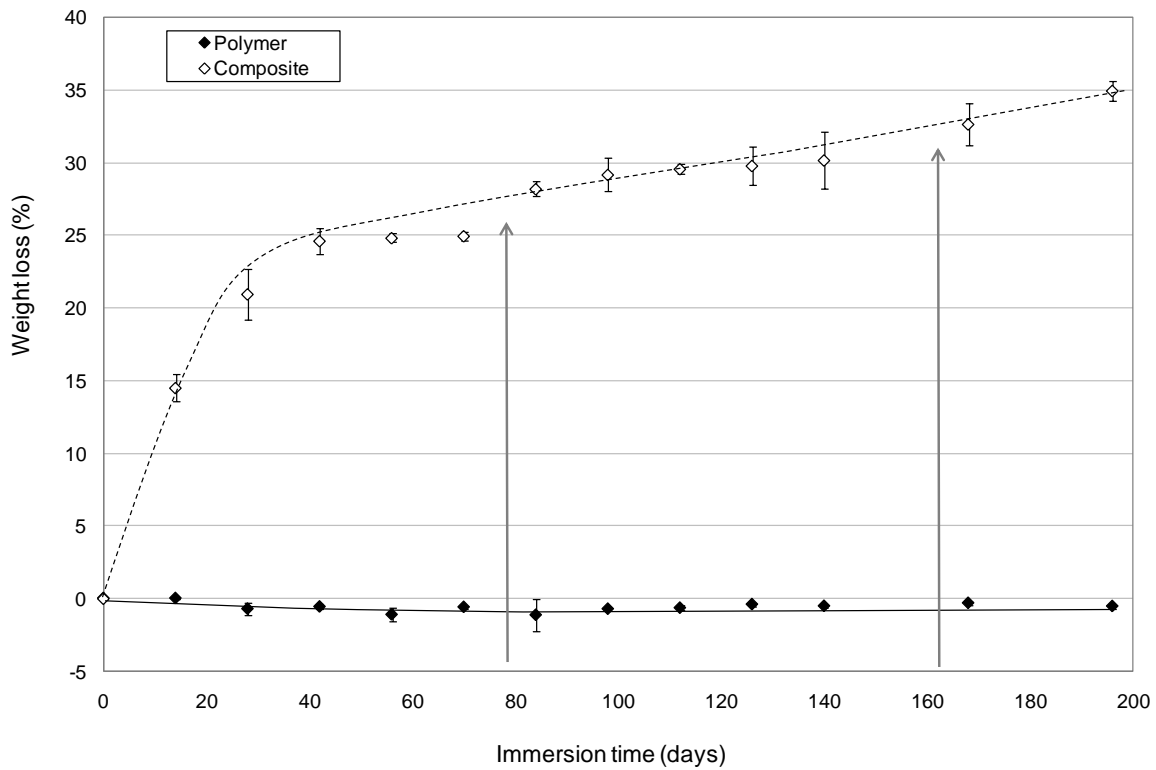


Figure 5: *In vitro* weight loss of PDLLA and PDLLA/Bioglass® composite in function of immersion time in PBS (the arrows indicates solution changes).

#### Water absorption

Water absorption into the polymer was <1% during the all the immersion period. The presence of bioactive glass increased the water absorption; indeed the composite has absorbed 100% of its weight in average in 98 days.

#### Morphologies of the specimens

After 6 months, the polymer appeared intact, whereas the composite exhibited some fractures on its surface (Fig. 6), consisting in dimensional changes and swelling.

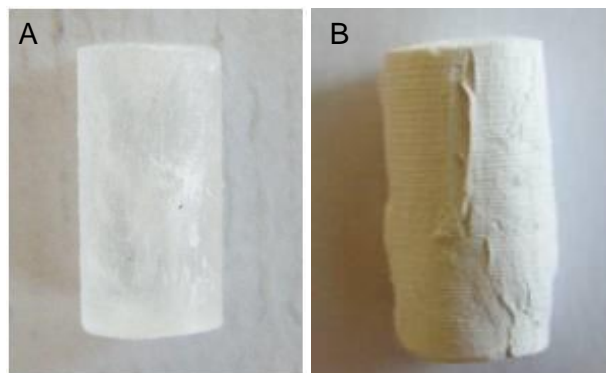


Figure 6: Polymer (A) and composite (B) specimens after 6 months of immersion in the PBS.

These observations were confirmed by X-ray tomography. Even after 6 months, polymer specimens appeared intact (Fig. 7 B). On the contrary, cracks were already observed at 14 days inside and at the periphery of the composite samples (Fig. 7 D). The number of cracks increased up to 1 month and then did not change significantly.

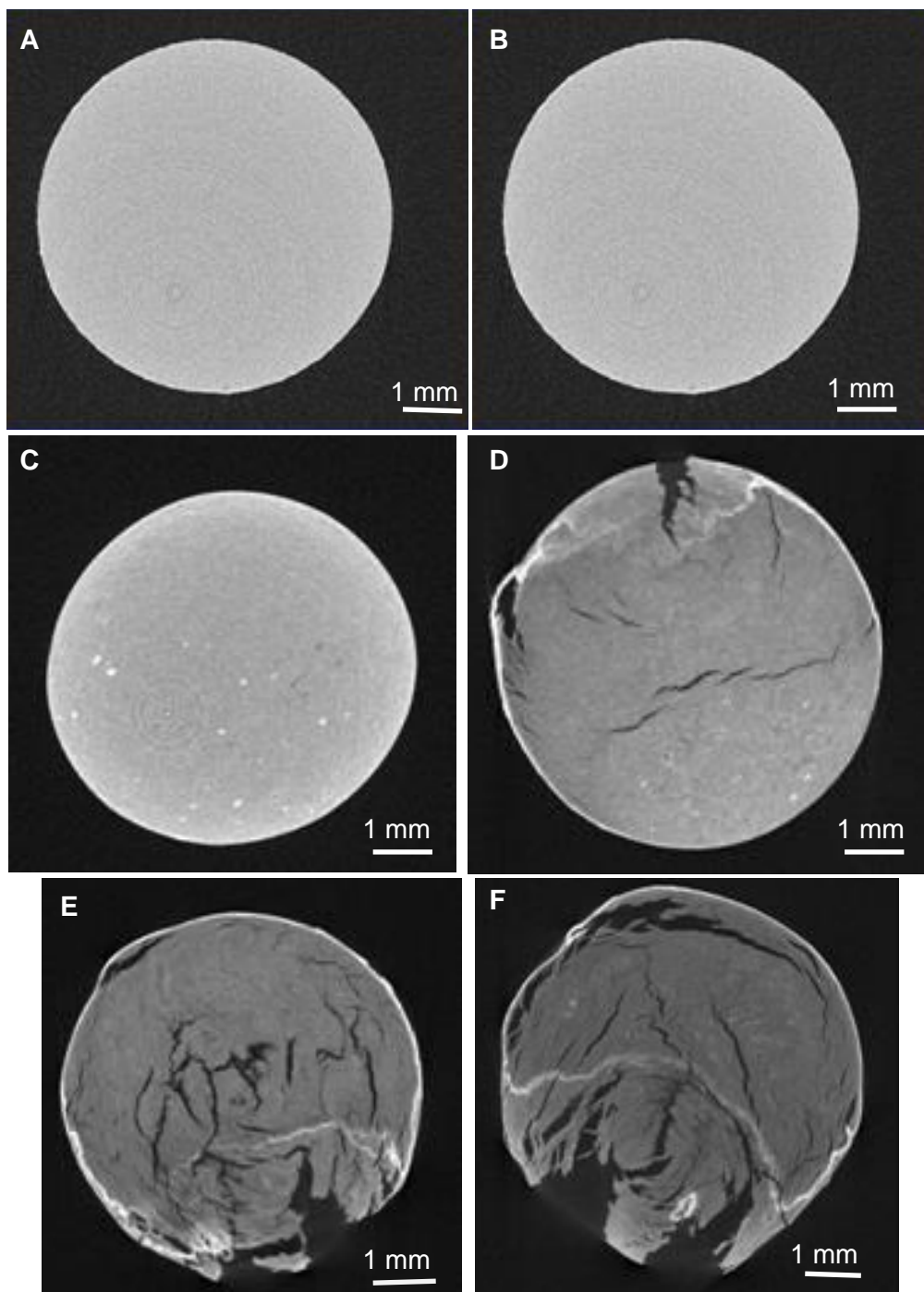


Figure 7: Computed imaging tomography of: the polymer before (A) and after 6 months of immersion in PBS (B); of the composite before (C), after 14 days (D), 1 month (E) and 2 months (F) of immersion in PBS.

### Inherent viscosity and compressive strength

We notice that before immersion polymer and composite specimens exhibited similar compressive strength, it can be explained by a polymer molecular weight closer to that of the composite after sterilization.

Compressive strength of the polymer did not change significantly during the 3 months of immersion, whereas inherent viscosity decreased of 30% (Fig. 8). Results were totally different for the composite (Fig. 9). After 14 days of immersion, compressive strength of the composite already decreased of 60%. After 3 months, compressive strength of the composite was of 5 MPa, whereas it was still of 80 MPa for the polymer. Compressive tests were stopped at this time, because the composite specimens were too degraded to be tested. Inherent viscosity of the polymer matrix of the composite decreased also with time, after 3 months it was 40% of its initial value.

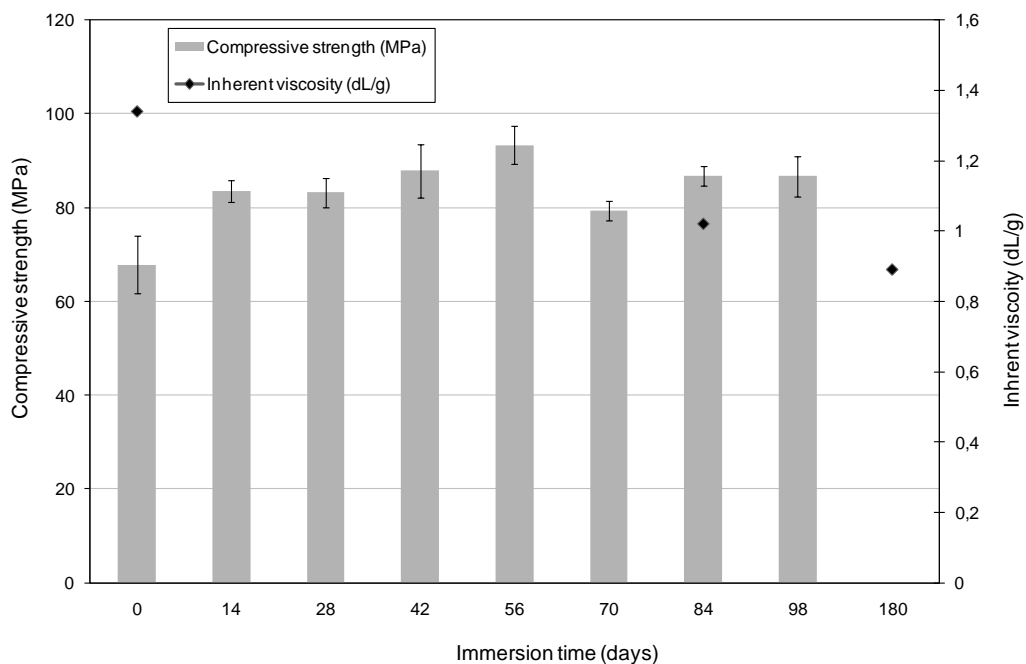


Figure 8: Compressive strength and inherent viscosity of the polymer in function of immersion time in PBS.

The results are in line with X-ray tomography observations, since most of the cracks are formed between 15 days and 1 month and most of the compressive strength is lost in this period.

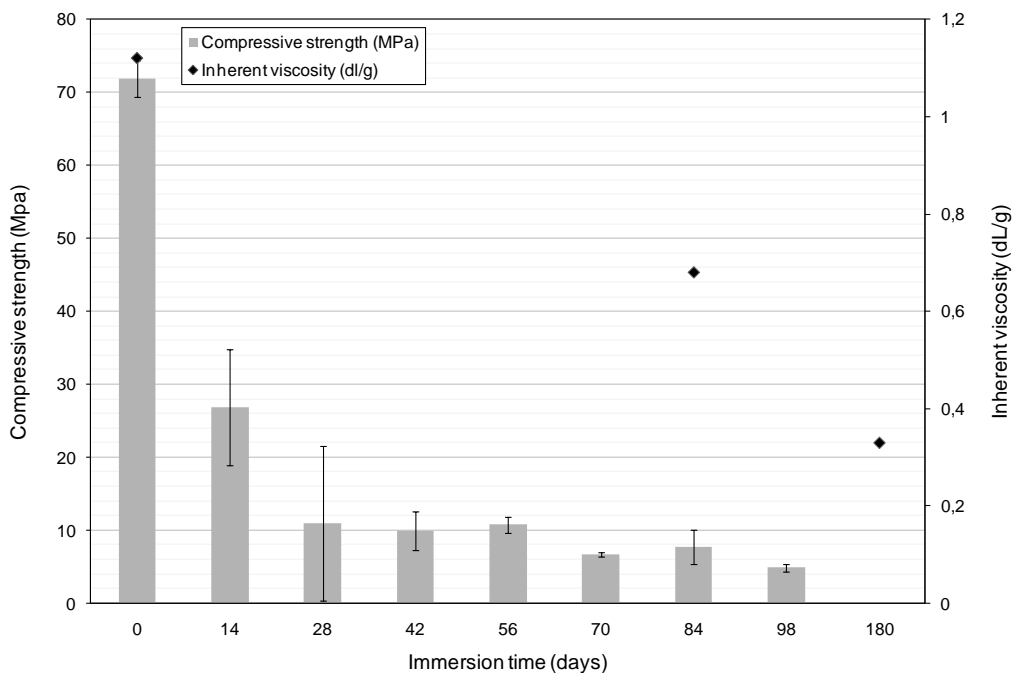


Figure 9: Compressive strength and inherent viscosity of the composite in function of immersion time in PBS.

#### Evolution of molecular weight

We have observed in the Chapter B that injection moulding affected strongly molecular weight of the polymer matrix, and it was more important for the composite. Similar results were observed here, but another step in the drop of the molecular weight was also noticed.

After sterilization a dramatic reduction of molecular weight was observed for the polymer of approximately 75%. This decrease in the molecular weight of the polymer, that became closer to composite one (42 Kg/mol) explained the similar compressive strength.

The following table (Table 4) summarizes the results of the polymer and composite molecular weight evolution after elaboration process by injection moulding, gamma sterilization and immersion in PBS during 6 months.

Materials		Mw (kg.mol <sup>-1</sup> )
Polymer	Polymer granules	520
	After injection moulding	260
	After sterilization	66
	After 6 months in PBS	55
Composite	Composite granules	355
	After injection moulding	88
	After sterilization	42
	After 6 months in PBS	21

Table 4: Changes in polymer and composite weight average molecular weight after injection moulding, sterilization gamma and immersion during 6 months in PBS.

The important composite water uptake had clearly an effect on the degradation of the composite. Since the molecular weight of the composite sample was observed to decrease



much faster than polymer one (Fig. 10). After 6 months of immersion in PBS, polymer and composite have lost 17 and 49% of their initial weight average molecular weight respectively.

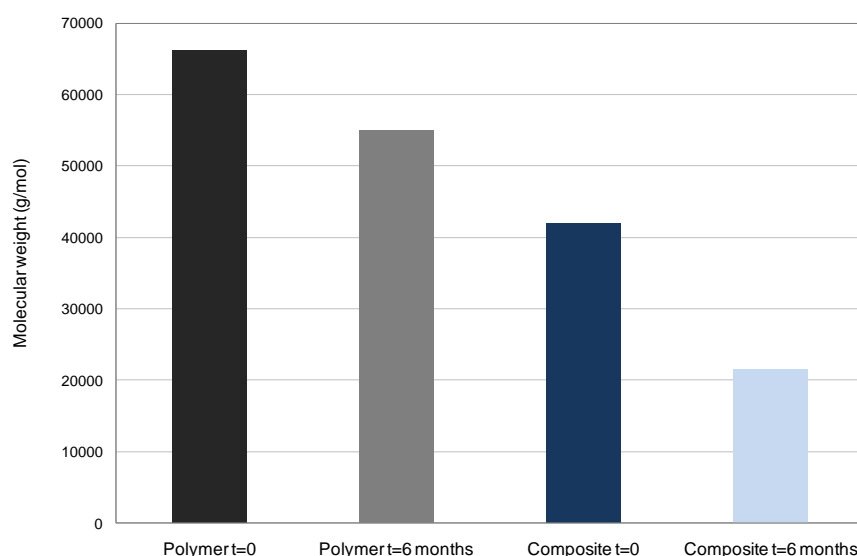


Figure 10: Polymer and composite weight average molecular weight before and after 6 months of immersion in PBS.

The polymer did not show any sign of degradation, physical or mechanical, during the 6 months of immersion. Inversely, the composite exhibited an important reduction of the physical and mechanical properties after immersion in the PBS during 6 months. The polymer did not absorb water, and did not loose weight during the 6 months of immersion. Addition of Bioglass® seems therefore to accelerate the polymer degradation.

### D.III.2 Cytocompatibility *in vitro*

First experiments have shown that Bioglass® particles were responsible of alkaline cations salting-out that made the pH of the culture medium and so toxic for the cells. In order to prevent this increase of pH, all test materials were preconditioned in Simulated Body Fluid (SBF) during 1 month. Materials treated were thus less reactive. In other words, the alkaline ions salting-out was reduced.

We have actually observed a small increase of the pH for the composite from 7.4 to 7.8 during the first days of pre-treatment in SBF. Then the pH decreased progressively to 7.1 after 20 days.

Results for cells proliferation showed an increase of cells number with time over the 10 days period on all the materials (Fig. 11). The control presented the most important number of cells, and number of cells is higher on the polymer than of the composite.

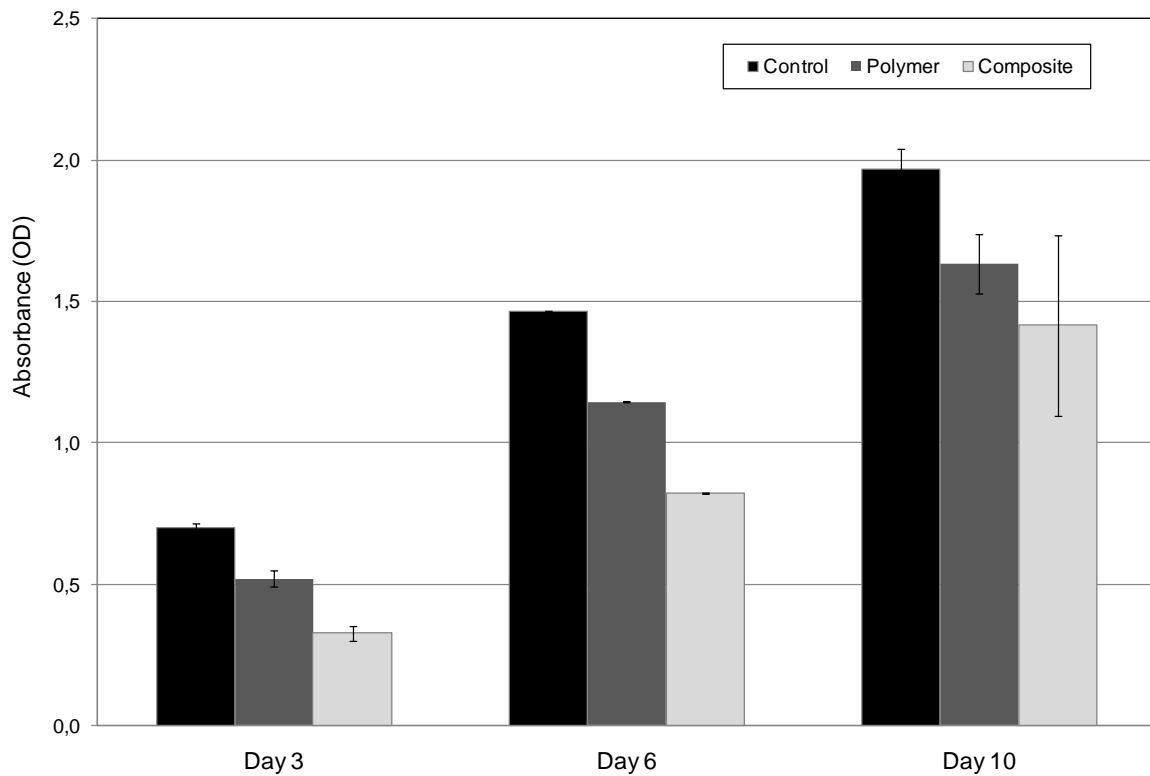


Figure 11: Optical density corresponding to the density of viable cells after 3, 6 and 10 days of incubation as measured by MTT assay, with standard deviations data.

This study has shown the cytocompatibility of the composite. Cellular growth appeared similar on polymer and composite at day 10.

### D.III.3 Biocompatibility *in vivo*

*In vitro* testing has shown an absence of toxicity for cells for both polymer and composite materials. However, this type of characterization is not able to demonstrate the tissue response to materials, but only an osteoblastic cell line response. In addition, this test can overestimate toxicity of the material, due to a different environment. Indeed, pH regulation of the body, as well as dynamic environment, is not reproduced *in vitro*. Inversely, *in vivo* implantation allows the evaluation of materials in loaded situations over long time durations and in different tissue qualities.

The purpose of the study was to assess biocompatibility and osteoconductive properties of both polymer and composite materials. Biocompatibility was analyzed by implantation in two different tissues, muscular and bone tissues. Intramuscular implantation permits to know the reaction of the material in another tissue than the application tissue. Intramuscular implantation was also performed in order to know if the material has some osteoinductive properties.

### a) Macroscopic observations

---

After euthanasia, bone specimens were observed for macroscopic analysis. Fibrocartilage callus was observed on four bone specimens after 1 month and on only one specimen after 3 months. This reaction is a normal physiological reaction occurring at the beginning of the bone fracture healing. No inflammation sign was ever observed on the articulations.

One rabbit, from the 1 month group, died of a microbiological infection 15 days after the surgery. And one rabbit, from the 3 months group, died also after 15 days, for digestive reasons.

### b) Intramuscular implantation

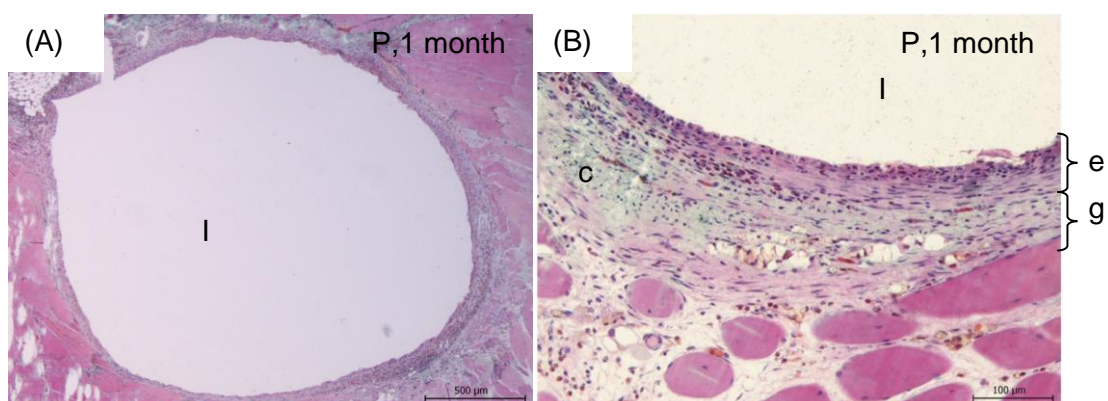
---

Two polymer implants in the one month batch, and three polymer implants in the three months batch, were not found after euthanasia. They have probably moved in the body.

#### Semi-quantitative histopathological analysis

On both materials, inflammatory reaction was minimal, consisting on a granuloma (macrophages associated to lymphocytes). Polymer and composite implants were surrounded by connective tissue containing large numbers of macrophages. Topographic view of an implant surrounded by striated muscle is presented on the figure 12A. Macrophages presented an abundant cytoplasm, eosinophil, with cytoplasmic limits well defined, regular nucleus, with epithelioid type aspect (Fig. 12B). The granuloma thickness decreased between 1 and 3 months after implantation (Table 5).

At distance of some polymer implants, we observed a matrix ring with fibroblasts and collagen (Fig. 12B) colored in blue by Goldner trichrome. Some polymer implants presented a plasma cells layer deeper (Fig. 12D), attributed to a foreign body reaction.



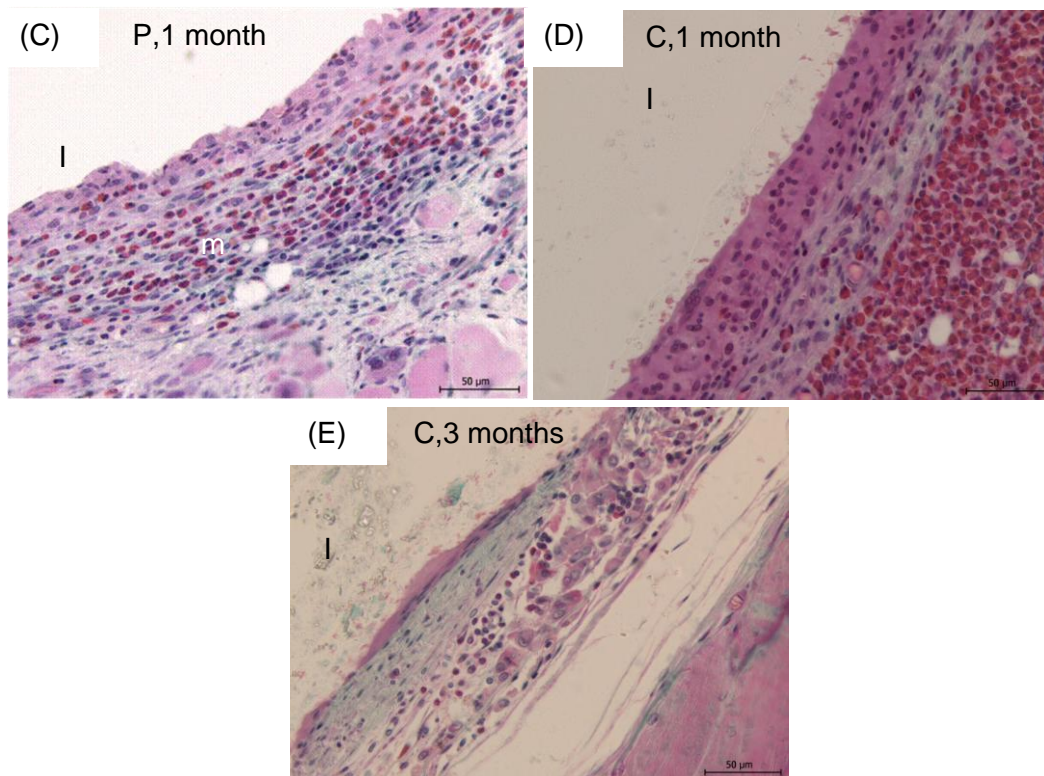


Figure 12: Histological examinations of sections of the dorsal muscle after Masson-Goldner stain. One month post-implantation (A) polymer, original magnification x5; (B) Polymer implant, original magnification x40; (C) Polymer implant, original magnification x40; (D) Composite implant, original magnification x20. Three months post-implantation (E) Composite implant, original magnification x40. (I = implant; e = epithelioid-giant-cellular reaction; g = granuloma; c = collagen; m = macrophage).

	Polymer		Composite	
	1 month	3 months	1 month	3 months
Granuloma	3	2	3	2
Plasma cell	1	1	1	1
Eosinophil granulocyte	0	1	1	1
Fibroblast and collagen	1	1	1	1
Angiogenesis	0	0	1	1

Tableau 5: Semi-quantitative histopathological analysis of the polymer and composite implanted in dorsal muscular tissue after 1 and 3 months. Index: (0) Absence; (1) Slight; (2) Moderate; (3) Marked.

In conclusion, this reaction can be defined by three levels:

- (1) Epithelioid and giganto-cellular reaction at the implant contact: characterized by the presence of macrophages, having close morphology to prickle cells.
- (2) Granuloma: presence or not of this granuloma characterized by plasma cells and some eosinophil granulocytes.
- (3) Light fibrosis: at distance of the implant, we can see or not an extracellular matrix.

For both polymer and composite, at 1 and 3 months, inflammatory reaction stayed similar and minimal. The implant was well integrated in the muscle with very little fibrous tissue encapsulation.

c) Intraosseous implantation

---

Tomography analysis

Tomography observations showed that no degradation occurred on polymer and composite implants (Fig. 13 B to E). Images revealed a layer of bone around all the implants as soon as 1 month. This bone layer suggests formation of new bone *in vivo*. It could be also argued that this bone layer was due to bone pushed during the surgery.

To assess this issue, scan was also conducted on a “dummy” composite cylinder (*length: 12 mm; diameter: 6 mm*) implanted in femoral condyle of dead rabbit (Fig. 13 A). This layer is not present around the “dummy” implant.

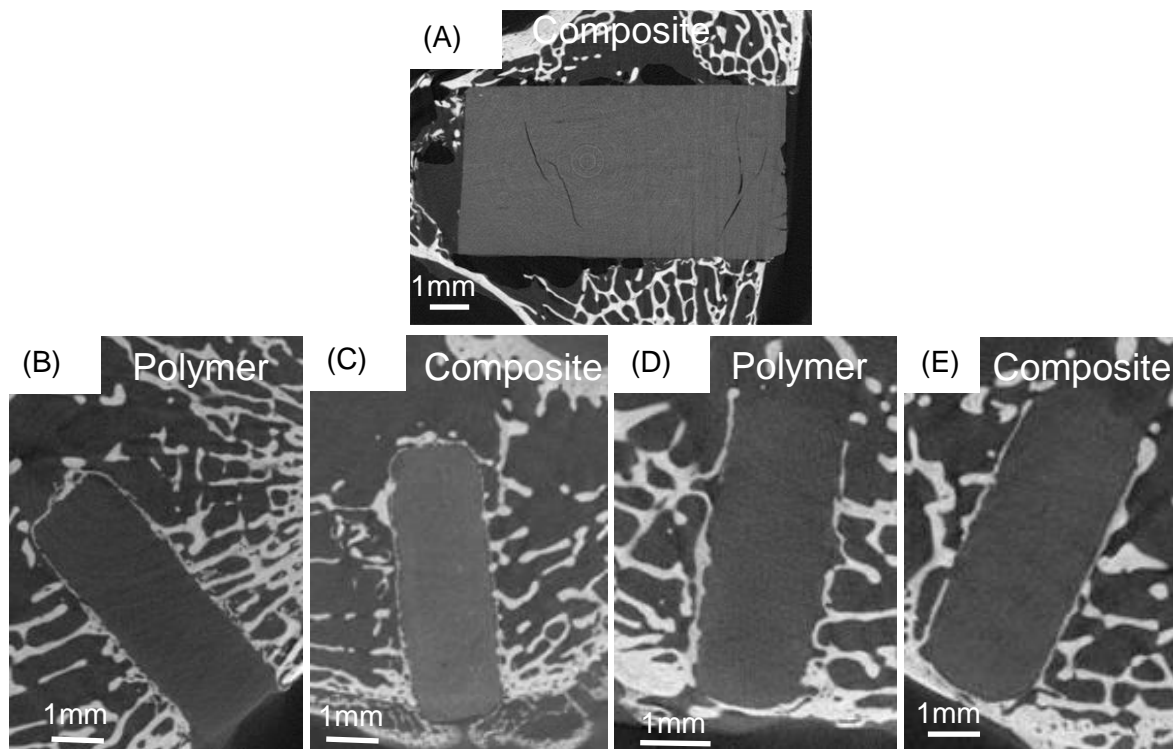


Figure 13: Tomography observations of (A) the composite “dummy”; (B and C) polymer and composite at 1 month (C); (D and E) polymer and composite at 6 months after implantation.

Therefore X-ray tomography clearly demonstrated line apposition around the implants as soon as 1 month. It is even clearly observed in the 3D picture (Fig. 14).

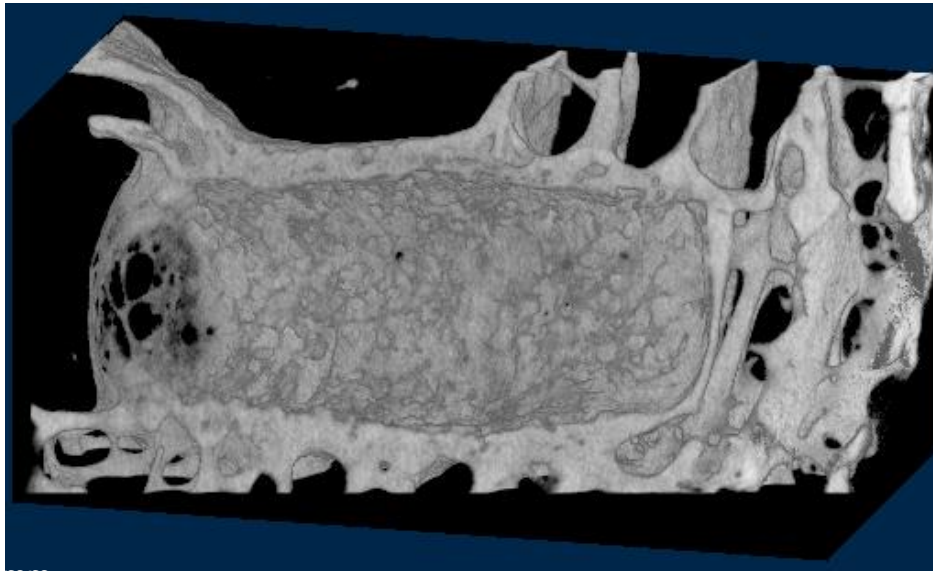


Figure 14 : 3D reconstruction of the bone present around a composite implant after 6 months of implantation (with ImageJ software).

Semi-quantitative histopathological analysis

The following table (Table 6) presents the semi-quantitative histopathological analysis of the polymer and composite implanted in the femoral condyles after 1, 3 and 6 months.

Time period	Material	Number of materials tested	Fibrin	Necrosis	Osteolysis	Tissue degeneration	Polymorphonuclear cells	Lymphocytes	Plasma cells	Macrophages	Giant cells/osteoclasts	Intervening soft tissue	Newly formed bone	Osteointegration	Osteoconduction	Bone remodeling	Neovascularization	Degradation
1 month	Polymer	6	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	2	0
	Composite	6	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	2	0	2	0
3 months	Polymer	5	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	2	2	0
	Composite	3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	2	0	2	0
6 months	Polymer	7	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	2	2	2	2	2	0
	Composite	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	2	2	2	1

Table 6 : Semi-quantitative histopathological analysis of the polymer and composite implanted in femoral condyles of rabbits after 1, 3 and 6 months. Index: (0) absence; (1) slight; (3) moderate; (4) marked; (5) severe.

At 1 month, a slight line of intervening fibrous tissue was frequently observed at the interface with the implants. Interfacial macrophages of a slight grade associated with a few multinucleated giant cells were encountered on polymer and composite materials. Lymphocytes were also observed on the composite.

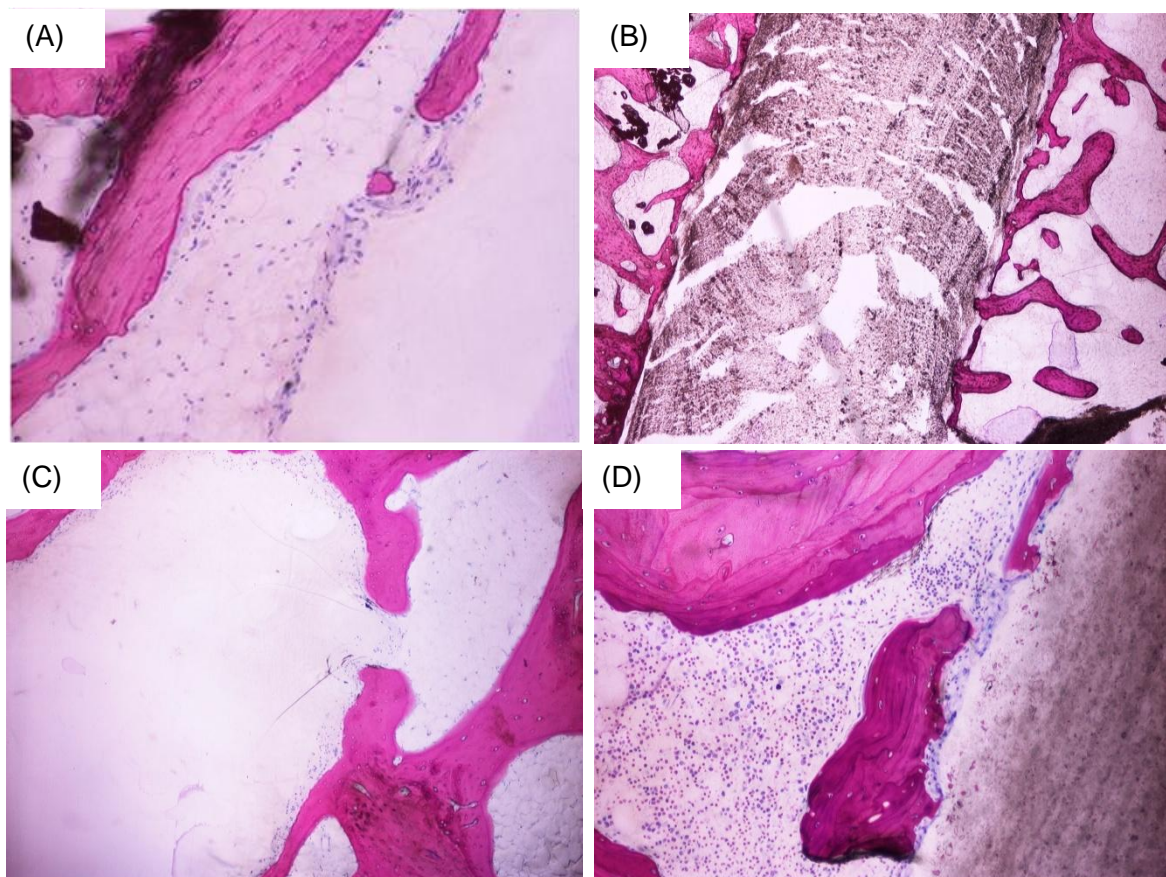
A thin woven bone tissue running along the polymer and composite implants was observed on portion on the implants positioned within the cancellous bone tissue (Fig. 15 B). No direct bone material contact was detected on the polymer at this time (Fig. 15 A). Whereas frequent images of direct bone material contact was observed on portion of composite implants (Fig. 15 B).

New bone had formed around all materials even at 1 month. There was a slight difference between polymer and composite materials, with a slight higher new bone amount on the composite surface compared to polymer one.

At 3 months, inflammation intensity decreased as compared to 1 month for both polymer and composite implants (Fig. 15 C). The level of newly formed bone, implant osteointegration and bone remodeling around the polymer implants was higher at this time. It is difficult to conclude for the composite implants, because three out of six implants were unfortunately implanted in the medullar cavity or in a juxta-medullary position. In the two remaining exploitable sites, a slight grade of bone formation was observed around the implant.

At 6 months, the inflammatory reaction with macrophages and lymphocytes infiltration was associated with a few signs of osteolysis. But it was quite maintained compared to 3 months results. Bone formation and osteointegration was increased for the polymer. But it was again difficult to conclude for the composite, because three out of seven implants were found in the medullar cavity, and two other implants have shown a juxta-medullary position. Overall, the inflammation intensity was maintained as compared to 3 months. In the two remaining exploitable sites, a moderate grade of bone formation was observed around the implant with limited signs of direct bone material contact.

No evidence of polymer degradation was visible at any time. However a slight evidence of composite degradation was visible for the composite at 6 months (Fig. 15 F). Indeed some phagocytosing cells showed intracellular presence of material particles. However no signs of peripheral particulate dissemination were observed and the implants maintained their structure.



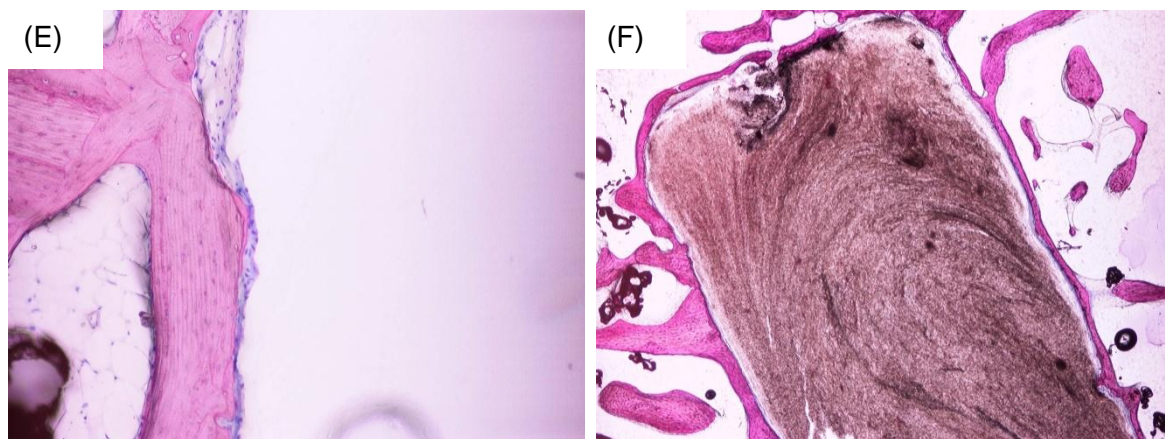


Figure 15: Histological examination of central longitudinal section of the specimen implanted in the lateral condyle. One month after implantation: (A) Polymer specimen, original magnification x10; (B) Composite specimen, original magnification x2. Three months after implantation: (C) Polymer specimen, original magnification x4; (D) Composite specimen, original magnification x10. Six months after implantation: (E) Polymer, original magnification x10; (F) Composite specimen, original magnification x2.

Implantation study has revealed a good biocompatibility of both polymer and composite materials. Polymer and composite were not degraded after 6 months of implantation, except the presence of minor signs of degradation on the composite. Bioglass® addition accelerated the bone growth on the surface of the implant clearly at 1 month after implantation.

## D.IV. DISCUSSION

---

### D.IV.1 Impact of sterilization on the polymer matrix molecular weight

First of all we observed that sterilization of the polymer reduced considerably its molecular weight. Several authors have observed a similar reduction of molecular weight after irradiation. Claes et al.<sup>15</sup> observed a reduction of 72% of the molecular weight of the same copolymer after gamma-sterilization by <sup>60</sup>Co irradiation with a dose of 28 KGy. Tuomo et al.<sup>25</sup> noticed similar decrease of inherent viscosity from 6.1 to 0.9 dl/g on the same copolymer but self-reinforced, after gamma irradiation with a minimum dose of 25 kGy. Suuronen et al.<sup>26</sup> observed a Mw reduction of 77% after gamma sterilization (77%) on the SR-PLLA. Similar tendency was also reported on composites (HA/PLLA) after gamma sterilization by <sup>60</sup>Co irradiation. This observation highlights the importance of the sterilization on the final properties of the polymer matrix. It would be interesting to find another sterilization protocol in order to increase the composite Mw.



### **D.IV.2 Acceleration of polymer matrix degradation *in vitro* with addition of Bioglass® particles**

The purpose of this study was to determine the effect of Bioglass® on the polymer degradation rate *in vitro*.

After 6 months, the polymer did not show any signs of degradation. The polymer weight did not change and the material did not absorb water significantly. Grizzi et al.<sup>27</sup> showed that degradation of the poly(DL-lactic acid) depended on specimen size. But even on thin films they observed degradation of the polymer only after 25 weeks in PBS. Our results are consistent with the observations made by Saha et al.<sup>28</sup> on a PDLLA copolymer.

This study showed that Bioglass® addition accelerated polymer degradation. Some studies reported that the alkaline salting-out of the bioactive glass could neutralize the acid environment generated by the polymer degradation. Li et al.<sup>18</sup> have reported that pH of the PLGA immersed in PBS fell to a value of 4.3 in 8 weeks while the pH of the Bioglass® 45S5 (20wt.%)/PLGA composite was maintained between 8.15–7.1 throughout the soaking period. We observed also this buffering effect, because in presence of the composite, pH of the PBS decreased only to 7.1 after 7 weeks. However solution pH remained rather stable in presence of the polymer, confirming that the polymer is not submitted to degradation. But the large reduction of the pH observed by Li et al.<sup>18</sup> in presence of the PLGA can be explained by the different nature of the polymer; indeed the PLGA presents a higher degradation rate than the PDLLA. Moreover composite studied by Li et al.<sup>18</sup> is a scaffold and therefore no comparable directly with the behavior of a dense composite.

The small pH decrease that we observed in presence of the composite can be due to polymer chains released by polymer matrix hydrolysis. Indeed, fluid penetration in the composite matrix was related to the presence of the P(DL,L)LA/ Bioglass® interfaces and surface cracks that facilitated fluid penetration and leaching of small polymer chains. This hypothesis was confirmed by the high percent of water absorption observed with the composite. But even if we observed a reduction of the pH in presence of the composite, this reduction remains very weak, suggesting a buffering effect of the Bioglass®.

This acceleration of the degradation with addition of bioactive glass particles was confirmed by several authors<sup>20, 21</sup> in the literature. This phenomenon was correlated to the important absorption of water, promoted by the hydrophilic character of the bioactive glass particles. Indeed, Rich et al.<sup>20</sup> observed that composites with smaller size of bioactive glass particles absorbed more water than composites with bigger bioactive glass particles. Smaller bioactive glass particles had a higher area/volume ratio and therefore a more important surface available to absorb water.

After 6 months, molecular weight reduction of the composite is in agreement with other studies<sup>25</sup>. But the loss of mechanical properties (60%) that happened during the first 15 days was very rapid compared with other studies in the literature<sup>22, 25</sup>. Tuomo et al. observed a decrease of less than 2% of bending strength after 15 days on a composite SR-P(L/DL) 70:30 reinforced with 19% of bioactive glass 13-93 having a similar molecular weight (42 kg.mol<sup>-1</sup>). This difference can be explained by the difference in the processing method. Their composites were produced by extrusion and then self-reinforced by solid state die-drawing. This process that oriented the polymer chains can be at the origin of the better initial mechanical properties. Similarly Shikinami et al.<sup>22</sup> observed a reduction of less than 10% of the initial bending strength on the composite PLLA/HA (30%) after 5 weeks in PBS. This slow

reduction of the bending strength compared with our study can be explained by the higher initial molecular weight of their composite ( $210 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). However a similar reduction of the mechanical properties was observed by Verheyen et al.<sup>2</sup> on a PLLA/HA (20 and 30 %) composite with a molecular weight of  $125 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ . After 3 weeks of immersion, bending strength of the polymer and the composite were reduced of 50%.

It is difficult to compare polymer and composite behaviors *in vitro*, because their molecular weight is different. However it appeared that addition of Bioglass® particles accelerate polymer degradation by promoting water penetration. Indeed the presence of particles in the matrix creates some cracks and interface filler/matrix that promotes water penetration. This decrease in water absorption was correlated to a significant weight loss.

These results indicate the possibility to modulate the degradation rate of the polymer by adding Bioglass® to the polymer matrix. This is relevant for bone repair applications knowing that degradation rate of temporary implants must match the rate of formation of new bone tissue.

---

### **D.IV.3 Cytocompatibility *in vitro* of the P(L,DL)LA/Bioglass® composite**

Bioglass® 45S5<sup>29</sup> and poly-lactic acid<sup>30, 31</sup> cytocompatibility have already been demonstrated. The objective in this work was to demonstrate the cytocompatibility of the P(L,DL)LA polymer matrix reinforced with Bioglass® particles and to estimate the effect of the Bioglass® on the cellular proliferation.

Several studies of cytocompatibility *in vitro* have already been carried out on composites made of poly( $\alpha$ -hydroxy)esters filled with bioactive glass particles<sup>32-35</sup>. But most of them were performed on scaffolds, or on thin films, but never on dense composites similar to our specimens. The purpose here was to complete the literature by testing samples that were elaborated by the same process than final implants.

Osteoblastic cells culture on the different materials has shown a good cytocompatibility of the polymer and the composite. Addition of Bioglass® did not increase cellular growth but on the contrary it seems to slightly decrease it. But this small reduction of growth cells can be due to an increase of the pH linked to cations salting-out. Some authors<sup>33, 35</sup> working on PDLLA/Bioglass® scaffolds with different filler ratios (5 and 40%), did not observe significant difference in cells growth with Bioglass® increase, and they did not observed increase of pH for high amount of Bioglass®. It can be explained by the fact that our specimens were dense and had a more important thickness (2mm). This higher dimension of specimen is traduced by a more important Bioglass® concentration in the culture media that may be at the origin of a higher pH. Concentration of Bioglass® in the culture media during cellular culture is around 150 mg/mL, for comparison in bioactivity testing it was only of 5 mg/mL.

#### **D.IV.4 In vivo biocompatibility of the composite and acceleration of bone growth**

The objective of this work was to demonstrate the better osteoconductive properties of the composite implant compare to polymer one. Study of implantation in the rabbit has shown that at 1 month after implantation in the bone tissue, composite implants showed faster signs of osteointegration as compared to the polymer implants. Both implants exhibited a good local tolerance even though the composite implants were slightly more locally inflammatory. After 3 and 6 months, it was difficult to objectively compare both implants as the composite implant was mostly found intramedullarily compromising the bone healing evaluation in respect to the polymer implant consistently encountered within the cancellous compartment of the implanted sites. No significative difference appeared between polymer and composite implants after 3 and 6 months. Histological examination revealed very minor inflammation and a good biocompatibility of both polymer and composite.

We have shown a significative difference in bone growth between polymer and composite, which is in agreement with the literature. A lot of authors have shown that adding bioactive ceramic to biodegradable polymer induced bone ingrowth and bony tissue replacement. Furukawa et al.<sup>3</sup> have shown new bone formation at 2 weeks after implantation on the composites PLLA/HA (30, 40%) whereas little bone contact was observed in unfilled PLLA implants. Similarly Aunoble et al.<sup>36</sup> have observed by histological examination a better bone consolidation with the composite PLLA/ $\beta$ -TCP (60%) than with the polymer. We reported only one study that did not observe an increase of bone growth with bioceramic particles addition. Prokop et al.<sup>37</sup> implanted P(L/DL)LA filled with  $\beta$ -TCP (10%) in the femoral condyles of sheep. They did not see significant improvement of bone response with the composite. It can be explained by the lower amount of  $\beta$ -TCP added in the polymer matrix.

Almost no sign of polymer or composite material degradation was observed overtime except for the composite implants at 6 months showing discrete signs of degradation. It is not surprising that polymer did not degrade after 6 months. It is in agreement with literature. Aunoble et al.<sup>36</sup> did not observe any sign of PLLA degradation, since after 6 months of implantation in the femoral sites of rabbit. Concerning the kinetics of the composite degradation, results are divergent in the literature. Shikinami et al.<sup>7</sup> observed a beginning of degradation of a composite PLLA/HA (30%) only after 2 years of implantation in distal femoral condyle of rabbits. But inversely, several authors have already observed signs of degradation after 6 months. It is the case of Aunoble et al.<sup>36</sup> on the composite PLLA/  $\beta$ -TCP (60%) implanted in the femoral condyles of rabbits. At 6 months the polymer appeared intact whereas some composite implants had broken up. This acceleration of the degradation observed by Aunoble can be explained by the higher amount of the filler. But this result is surprising because this polymer being crystalline, it should degrade more slowly compare with the copolymer P(L/DL)LA. It is difficult to compare all these studies because the nature of polymer and filler are different.

### **D.IV.5 Comparison between *in vitro* and *in vivo* degradation**

We observed that incorporation of Bioglass® particles in the polymer matrix accelerated significantly the degradation of the composite *in vitro*. This result illustrates the positive effect of adding Bioglass® to the polymer matrix. Indeed it is important that composite implant resorbed rapidly after bone healing, avoiding inflammation risks due to the presence of polymer debris. However a comparison of the kinetics of degradation *in vitro* and *in vivo* showed that extrapolation between *in vitro* and *in vivo* behavior is not easy. We observed that the kinetics of the composite degradation was reduced *in vivo*, as compared to its kinetics of degradation *in vitro*, it may be due to a different local environment. Similar results were observed by Verheyen et al.<sup>2</sup> on a PLLA/HA composite. They observed that kinetics of degradation *in vivo*, in the subcutis of goats, was slower than kinetics of degradation *in vitro*, in phosphate buffered saline. During immersion of the material in the PBS solution, this one is permanently submitted to a hydrolytic environment. Inversely, during implantation the material was less affected by hydrolytic reactions from the fluid, because it was surrounded by bone tissue.

### **D.V. CONCLUSION**

The P(L,DL)LA/Bioglass® 45S5 composite associates advantages of both phases, the mechanical strength assured by the polymer matrix and the bone growth ability promoted by the Bioglass®. Addition of Bioglass® allows accelerating the degradation of the composite *in vitro*. However, the kinetics of degradation *in vivo* was not similar, highlighting the limits of the correlation between *in vitro* and *in vivo* analysis. A complementary study, at longer time, would be interesting to have an idea of the degradation kinetics of the composite *in vivo*. Biocompatibility of the P(L,DL)LA/Bioglass® 45S5 (30 wt.%) composite was confirmed *in vitro* and *in vivo*. Implantation studies have revealed that presence of Bioglass® accelerates bone integration. This study confirms that addition of Bioglass® improves the implant osteointegration. The results of *in vitro* and *in vivo* material studies suggest therefore that the PDLLA/Bioglass® composite is a promising material for bone applications.

## References

1. Bergsma JE, De Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, 16:25-31.
2. Verheyen CCPM, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Evaluation of hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: Mechanical behavior. *Journal of Biomedical Materials Research* 1992, 26:1277-1296.
3. Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T, Nakagawa Y, Okada Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Histomorphometric study on high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, 50:410-419.
4. Yasunaga T, Matsusue Y, Furukawa T, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles/poly(L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999, 47:412-419.
5. Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. A 5-7 year *in vivo* study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials* 2006, 27:1327-1332.
6. Ishii S, Tamura, J., Furukawa, T., Nakamura, T., Matsusue, Y., Shikinami, Y., Okuno, M. Long-term study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures: A 2-4-year follow-up study in rabbits. *Macromolecular Rapid Communications* 2003, 21:117-132.
7. Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). *Biomaterials* 2005, 26:5542-5551.
8. ISO. Implants chirurgicaux - Copolymères et mélanges à base de polylactide - Essais de dégradation *in vitro*. ISO 15814, Genève, 1999, 10 p.
9. Verheyen CCPM, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, De Groot K, Rozing PM. Hydroxylapatite/poly(L-lactide) composites: An animal study on push-out strengths and interface histology. *Journal of Biomedical Materials Research* 1993, 27:433-444.
10. Hench LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006, 17:967-978.
11. Hench L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1998, 81:1705-1728.
12. Li S, McCarthy S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (-lactide). *Biomaterials* 1999, 20:35-44.
13. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 1999, 48:342-353.
14. Therin M, Christel P, Li S, Garreau H, Vert M. *In vivo* degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids): validation of *in vitro* findings. *Biomaterials* 1992, 13:pp.594-600.
15. Claes LE, Ignatius AA, Rehm KE, Scholz C. New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: Design, mechanical properties and *in vitro* degradation. *Biomaterials* 1996, 17:1621-1626.
16. Moser R, C., McManus AJ, Riley SL, Thomas KA. Strength retention of 70:30 poly(L-lactide-co-D,L-lactide) following real-time aging. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005, 75B:56-63.
17. Schwach G, Vert M. *In vitro* and *in vivo* degradation of lactic acid-based interference screws used in cruciate ligament reconstruction. *International Journal of Biological Macromolecules* 1999, 25:283-291.
18. Li H, Chang J. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. *Composites Science and Technology* 2005, 65:2226-2232.

19. Maquet V, Boccaccini AR, Pravata L, Notingher I, Jérôme R. Preparation, characterization, and *in vitro* degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2003, 66:335-346.
20. Rich J, Jaakkola T, Tirri T, Närhi T, Yli-Urpo A, Seppälä J. *In vitro* evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2002, 23:2143-2150.
21. Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Barrias CC, Barbosa MA. *In vitro* degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. *Acta Biomaterialia* 2005, 1:411-419.
22. Shikinami Y, Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics. *Biomaterials* 1999, 20:859-877.
23. Zenati R, Pacard E. Method for preparing a composite material, resulting material and use thereof. Patent WO/2008/116984. 2 Octobre 2008.
24. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* 1982, 11:318-326.
25. Tuomo P, Matti L, Hannu P, Pentti R, Henna N, Pertti T. Fixation of distal femoral osteotomies with self-reinforced poly(L/DL)lactide 70 : 30/bioactive glass composite rods. An experimental study on rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2004, 15:275-281.
26. Suuronen R, Pohjonen T, Hietanen J, Lindqvist C. A 5-year *in vitro* and *in vivo* study of the biodegradation of polylactide plates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998, 56:604-614.
27. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(l-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995, 16:305-311.
28. Saha SK, Tsuji H. Hydrolytic Degradation of Amorphous Films of L-Lactide Copolymers with Glycolide and D-Lactide. *Macromolecular Materials and Engineering* 2006, 291:357-368.
29. Price N, Bendall SP, Frondoza C, Jinnah RH, Hungerford DS. Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997, 37:394-400.
30. Ignatius AA, Claes LE. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: Poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 1996, 17:831-839.
31. Jahno VD, Ribeiro, G.B.M., dos Santos, L.A., Ligabue, R., Einloft, S., Ferreira, M.R.W., Bombonato-Prado, K.F. Chemical synthesis and *in vitro* biocompatibility tests of poly (L-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007, 83A:209-215.
32. Helen W, Gough JE. Cell viability, proliferation and extracellular matrix production of human annulus fibrosus cells cultured within PDLLA/Bioglass® composite foam scaffolds *in vitro*. *Acta Biomaterialia* 2008, 4:230-243.
33. Blaker JJ, Gough JE, Maquet V, Notingher I, Boccaccini AR. *In vitro* evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2003, 67:1401-1411.
34. Tsigkou O, Hench LL, Boccaccini AR, Polak JM, Stevens MM. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass® composite films in the absence of osteogenic supplements. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2007, 80:837-851.
35. Verrier S, Blaker JJ, Maquet V, Hench LL, Boccaccini AR. PDLLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an *in vitro* cell biology assessment. *Biomaterials* 2004, 25:3013-3021.
36. Aunoble S, Clément D, Frayssinet P, Harmand MF, Le Huec JC. Biological performance of a new  $\beta$ -TCP/PLLA composite material for applications in spine

- surgery: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2006, 78:416-422.
37. Prokop A, Höfl A, Hellmich M, Jubel A, Andermahr J, Rehm KE, Hahn U. Degradation of poly-L/DL-lactide versus TCP composite pins: A three-year animal study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005, Volume 75B 304 - 310.

## APPENDIX TO THE CHAPTER D

### PROTOCOLE DE FABRICATION DU MÉTHYL MÉTHACRYLATE

#### Produits utilisés

- 1) Méthyl méthacrylate (Merck 800590.1000)
- 2) Dibutylphtalate (Merck 800919)
- 3) Peroxyde de Benzoyle (Merck 801641)
- 4) Oxyde d'aluminium activé sous forme de billes (BDH 27083)

#### Déstabilisation du méthyl métacrylate

- 1) Le méthyle méthacrylate est mis dans un bécher et une poignée d'oxyde d'aluminium (sous forme de billes) est ajoutée
- 2) Sous agitation pendant 15 minutes
- 3) Filtration
- 4) Ce protocole est répété deux fois avec de nouvelles billes d'oxyde d'aluminium
- 5) MMA1: MMA déstabilisé 80% + Dibutylphtalate 20% (volume/volume)

#### Préparation du MMA2 et du MMA3

- 1) MMA2: MMA1 + 1% (poids/volume) de peroxyde de benzole
- 2) MMA3: MMA1 + 2% (poids/volume) de peroxyde de benzole



**Semi-quantitative histopathological analysis of the polymer (P) and composite (C) implanted in femoral condyles of rabbits after 1, 3 and 6 months.**

Time period	Material	Animal N°	Fibrin	Necrosis	Osteolysis	Tissue degeneration	Polymorphonuclear cells	Lymphocytes	Plasma cells	Macrophages	Giant cells/osteoclasts	Intervening soft tissue	Newly formed bone	Osteointegration	Osteoconduction	Bone remodeling	Neovascularization	Degradation	
1 month	P	7379	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	-	
		7743	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2	-
		7803	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	2	-
		7542	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	-
		7768	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	1	0	2	-
		7562	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	-
	C	7379	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	2	-
		7542	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	2	1	3	0	2	-
		7562	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	-
		7743	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	2	-
		7768	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	3	3	0	2	-
		7803	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	2	-
3 months	P	7147	Fully positioned in the medular cavity																
		7226	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	2	2	2	0
		7381	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	2	0
		7503	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	2	2	2	0
		7618	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	1	2	2	2	0
		7622	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	2	2	2	0
	C	7147	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	1	0	2	0	2	2	0
		7226	Fully positioned in the medular cavity																
		7381	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	
		7503	Fully positioned in the medular cavity																
6 months	P	7090	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	0
		7206	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3	2	2	2	0
		7450	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	2	2	0
		7598	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3	2	2	2	0
		7629	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	2	2	0
		7739	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	2	2	0
	7883	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	2	2	1	2	2	2	0	
	C	7090	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	2	2	2	1
7206		Fully positioned in the medular cavity																	
7450	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	2	0	2	2	2	1		
7598	Fully positioned in the medular cavity																		
7629	Fully positioned in the medular cavity																		
7739	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	2	2	2	1	
7883	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	2	2	0	

## Conclusion générale

Un matériau composite P(L,DL)LA/bioverre 45S5 a été développé par la société Noraker pour une utilisation comme dispositif de réparation osseuse, par exemple comme vis d'interférence. L'objectif de cette thèse était d'effectuer une caractérisation exhaustive de ce matériau, d'un point de vue mécanique, physicochimique et biologique. Ce matériau étant destiné à remplacer temporairement une fonction osseuse, il se doit de répondre à un cahier des charges bien précis. On comprend ainsi la nécessité de connaître parfaitement les propriétés du matériau « candidat ». Ce matériau doit en effet se rapprocher au mieux du comportement du tissu dans lequel il va être implanté, à savoir le tissu osseux spongieux. Ce matériau composite organique/inorganique apparaît alors comme un candidat de choix. Pour répondre à sa fonction temporaire de réparation osseuse, il doit notamment avoir une tenue mécanique suffisante pour assumer ses fonctions mécaniques. Mais il ne doit pas non plus avoir un module élastique largement supérieur à celui de l'os, pouvant occasionner des phénomènes de stress-shielding.

La première étape de la caractérisation de ce matériau a donc été d'étudier son comportement mécanique. L'ajout de charges dans la matrice s'est traduit, comme attendu, par une augmentation de la rigidité du matériau. Cette propriété mécanique du composite est donc plus adaptée aux applications visées. Cependant la caractérisation de ce matériau a révélé une diminution des propriétés mécaniques (résistance en traction et compression, déformation à la rupture) avec l'ajout de charges, et notamment un comportement fragile en traction. Cette réduction des résistances mécaniques est plutôt le reflet d'une diminution des propriétés de la matrice. Une étude approfondie de l'évolution de la masse moléculaire de la matrice a en effet montré une perte importante de celle-ci au cours du procédé d'élaboration. Plusieurs causes ont alors été identifiées :

- au cours de l'élaboration des granules de composite, l'agitation mécanique, pour disperser le mélange, vient cisailer les chaînes ;
- le bioverre mis en solution avec le polymère pendant plusieurs heures va relarguer des ions alcalins, catalysant l'hydrolyse des chaînes de polymère ;
- le procédé de mise en forme : le moulage par injection est un procédé très offensif pour les chaînes de polymère, la présence de charges vient de même augmenter les contraintes de cisaillement appliquées sur les chaînes ;
- la présence d'une humidité, même résiduelle, peut venir catalyser l'hydrolyse des chaînes de polymère ;
- enfin le relargage alcalin du bioverre, tant recherché pour sa « bioactivité », peut venir lui aussi catalyser cette hydrolyse.

Malgré des propriétés mécaniques affichées suffisantes pour les applications visées, un meilleur contrôle de la masse moléculaire s'avère indispensable. En effet la masse moléculaire du composite obtenue par cette voie d'élaboration est assez faible et proche de la masse critique d'enchevêtrement. L'obtention d'un composite avec une masse moléculaire plus élevée permettrait de s'affranchir des risques occasionnés par une masse trop faible, qui risque après implantation de voir ses propriétés mécaniques chuter trop rapidement *in*

*vivo*. Un retour sur l'élaboration s'est donc avéré nécessaire pour mieux appréhender les différentes réactions intervenant au cours de l'élaboration. Un second mode d'élaboration, par pressage à chaud, a permis d'élaborer un composite avec une masse moléculaire plus élevée, conduisant notamment à des valeurs de dureté Vickers plus élevées. Ce résultat a ainsi confirmé les deux paramètres responsables de la chute de masse moléculaire : la température plus élevée et les contraintes de cisaillement soumises lors de l'injection. Une caractérisation structurale des composites obtenus par les deux voies d'élaboration a révélé une cristallisation de la matrice polymère au cours de l'injection. L'orientation des chaînes de polymère au cours de ce procédé ~~semblant favoriser~~ ainsi la recristallisation de la matrice. Enfin l'analyse mécanique dynamique est venue également confirmer que l'hydrolyse des chaînes de polymère est plus marquée en injection que pendant le pressage à chaud. En effet les analyses ont révélé l'apparition d'une relaxation à des températures inférieures à celle de la relaxation principale, liée à la relaxation de petites chaînes hydrolysées lors du procédé de mise en forme en présence de charges. Cette première partie de mon travail a ainsi mis en évidence l'impact du procédé d'élaboration sur les propriétés finales du composite. Elle a aussi montré le rôle du bioverre dans cette diminution des propriétés de la matrice. A ce stade du travail, un retour sur l'élaboration se révèle nécessaire afin de mieux contrôler les propriétés de la matrice.

L'un des intérêts majeurs de ce matériau composite, associant le verre bioactif 45S5 à une matrice polymère résorbable, est d'apporter ce caractère bioactif à la matrice. Il était donc nécessaire de confirmer que ce matériau composite présentait bien un caractère bioactif. La deuxième étape de cette thèse a donc consisté à déterminer l'effet du taux de bioverre sur la capacité « bioactive » du matériau composite. Plusieurs composites présentant des taux de charges croissants (20, 30 et 50% en masse) ont donc été caractérisés après immersion dans un fluide biologique. L'objectif était de décrire les processus de cristallisation et surtout de comparer les cinétiques de formation de la couche d'hydroxyapatite (HA) à la surface des différents composites. Cette étude a démontré le caractère bioactif de tous les composites, malgré une cinétique de cristallisation plus lente que dans le cas des particules de bioverre seules. De plus, il a été observé que la cinétique de cristallisation de l'HA était d'autant plus rapide que le taux de bioverre était important. Ainsi le composite chargé à 50% en bioverre va former une couche d'HA dès les premiers jours d'immersion dans le fluide biologique, alors que le composite chargé à 20% nécessitera plus de deux mois pour former une couche d'HA. Le composite 50% apparaissait alors comme un excellent candidat pour l'application recherchée. Il s'est cependant révélé très sensible à la dégradation hydrolytique lors de l'immersion dans un fluide biologique. Cette étude a donc permis de conclure que le composite chargé à 30% présentait certainement le meilleur compromis entre la tenue à la dégradation et la cinétique de formation de l'HA.

Le deuxième intérêt de l'association d'un polymère biorésorbable et de particules de bioverre est d'assurer un caractère biorésorbable au composite. En effet, celui-ci évite la seconde opération pour retirer l'implant et permet de s'affranchir des problèmes d'inflammation liés aux matériaux permanents. Cependant ce matériau biorésorbable doit pouvoir se résorber avec une cinétique adaptée à la repousse osseuse ayant lieu sur le site d'implantation. En effet un matériau ayant une cinétique de résorption trop rapide ne laissera pas à l'os le temps nécessaire pour recoloniser le site endommagé. A l'inverse, un matériau présentant

un temps de résorption trop long peut venir engendrer des phénomènes inflammatoires lié à des débris résiduels. On comprend ainsi l'intérêt de contrôler cette dégradation du composite dans le temps. Une simulation du comportement en dégradation du matériau *in vitro* a alors été mise en œuvre par immersion du matériau dans un tampon phosphate. Le suivi des paramètres physiques et mécaniques au cours de l'immersion a été réalisé. Cette étude a montré que le composite se dégradait assez rapidement *in vitro*, alors que le polymère n'apparaissait pas du tout dégradé. On a notamment observé une perte rapide des propriétés mécaniques du composite en compression. Cette étude a donc permis de confirmer que le bioverre accélère la dégradation du composite. La présence d'une interface entre les charges et la matrice permet la pénétration de l'eau dans le massif, induisant ainsi l'hydrolyse des chaînes de polymère. On souligne ici encore une fois l'intérêt de venir modifier la taille des chaînes de polymère pour ajuster la cinétique de dégradation du composite en fonction du cahier des charges de l'application visée.

Ce matériau étant destiné à être implanté, une étude de sa cytocompatibilité *in vitro* était indispensable. La cytocompatibilité des matériaux a été évalué par culture de cellules ostéoblastiques à la surface des composites. Une quantité limitée de matériau ne nous a malheureusement pas permis de conclure sur le rôle du taux de bioverre sur la prolifération cellulaire. Cependant les résultats des expériences faites sur le composite chargé à 30% ont montré une très bonne cytocompatibilité de ce composite, et ce de manière reproductible. La cytocompatibilité du composite validée nous a ainsi permis de mener une étude d'implantation du matériau composite *in vivo*.

La dernière étape de ce travail a consisté à évaluer la biocompatibilité du composite P(L,DL)LA/bioverre (30%) *in vivo*, par implantation pendant 1, 3 et 6 mois chez le lapin. Une implantation en intramusculaire a permis de connaître le comportement du matériau dans un autre tissu que le tissu fonctionnel et permettait également de répondre à la question du potentiel comportement ostéoinductif du composite. Enfin une implantation intraosseuse permettait d'évaluer l'évolution de la dégradation du matériau, le niveau d'inflammation engendrée par l'introduction d'un corps étranger et enfin la qualité de la repousse osseuse. Les résultats ont montré une inflammation mineure et normale, à la fois sur le site musculaire et sur le site osseux. L'implantation en intramusculaire n'a pas montré de caractère ostéoinductif du composite, ce qui d'ailleurs n'est pas une caractéristique recherchée pour les applications visées.

Contrairement aux résultats de l'étude *in vitro*, le matériau composite implanté dans l'os pendant 6 mois n'a montré aucun signe de dégradation, ou du moins très faibles. Ces résultats viennent en opposition avec ceux observés *in vitro*, soulignant les limites d'une telle comparaison des comportements.

Enfin l'implantation intraosseuse a montré une augmentation de la repousse osseuse pour le composite par rapport au polymère seul après 1 mois d'implantation. Cependant, un nombre insuffisant de résultats exploitables ne nous a malheureusement pas permis de conclure sur les groupes 3 et 6 mois.

Cette thèse a permis de mettre en évidence des modifications de la matrice polymère au cours de l'élaboration. Il apparaît nettement que malgré les forts avantages du bioverre en termes d'ostéoconduction, celui-ci peut s'avérer très agressif sur la matrice lors de

l'élaboration. Plusieurs perspectives sont envisageables pour venir atténuer la dégradation de la matrice au cours de l'élaboration. Une première stratégie consisterait à agir sur le bioverre. Le traitement thermique du bioverre permettrait en effet de diminuer son relargage et donc l'augmentation de pH associée. Une autre stratégie pourrait consister à intervenir sur le procédé d'élaboration lui-même : soit à la première étape d'élaboration des granules, en envisageant une élaboration par voie sèche ; soit lors de la mise en forme par injection, en travaillant en atmosphère inerte. Enfin, il serait intéressant d'étudier la dégradation du composite à des temps plus long *in vivo*, afin de déterminer la cinétique de dégradation de ce matériau. Il reste donc de nombreuses perspectives d'amélioration de ce composite, malgré les bonnes performances démontrées dans cette caractérisation.

## FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : **GINSAC**

DATE de SOUTENANCE : **24 Février 2011**

Prénoms : **Nathalie**

TITRE : **Caractérisation de matériaux composite polyacide lactique-bioverre pour application dans la réparation osseuse**

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 05 ISAL

Ecole doctorale : Ecole doctorale matériaux de Lyon

Spécialité : Génie des matériaux

Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 / et bis

CLASSE :

RESUME :

Ce travail de thèse porte sur la caractérisation d'un matériau composite polyacide lactique-bioverre pour application comme dispositif de réparation osseuse. Le bioverre étant trop fragile pour être utilisé seul comme dispositif de réparation osseuse, celui-ci est associé à une matrice polymère résorbable permettant d'apporter le caractère bioactif à des matériaux pouvant être mis en forme par des procédés de plasturgie.

Le matériau composite polyacide lactique-bioverre est ainsi mis en forme par injection à partir de granules élaborés par voie solvant. La caractérisation des propriétés de ce matériau composite a révélé une augmentation du module élastique avec l'ajout de charges, mais une diminution des contraintes maximales admissibles et de la déformation à la rupture. Les modifications des propriétés mécaniques ont été associées à une modification des propriétés de la matrice et notamment de sa masse moléculaire. Un autre mode d'élaboration par pressage à chaud a permis de limiter la dégradation du polymère. Une meilleure maîtrise de la masse moléculaire du composite serait ainsi un moyen de contrôler sa cinétique de dégradation *in vivo* et ainsi d'adapter ses propriétés en fonction du cahier des charges des applications visées.

Dans une seconde partie, l'effet du taux de bioverre sur le caractère bioactif du composite a été évalué par immersion dans un fluide biologique de composites chargés à 20, 30 et 50% (en masse de bioverre). Un scénario de cristallisation à la surface des différents composites a ainsi été proposé. Tous les composites se sont révélés bioactifs et d'autant plus que le taux de bioverre est élevé. Le composite chargé à 50% apparaît ainsi comme le matériau le plus bioactif, mais sa vitesse de dégradation est très rapide.

Ce matériau étant destiné à être implanté, une étude de biocompatibilité *in vitro* a été menée par culture de cellules ostéoblastiques à la surface des matériaux. Enfin la biocompatibilité du composite *in vivo*, son caractère biorésorbable et ostéoconducteur ont été évalués par implantation du matériau composite dans les tissus musculaires et osseux de lapins. Le caractère biocompatible, bioactif et ostéoconducteur du composite chargé à 30% en masse de bioverre en fait un candidat de choix pour les applications proposées.

MOTS-CLES : composite – polymère biorésorbable – bioverre – bioactivité – biocompatibilité

Laboratoires de recherche :

Matériaux Ingénierie et Science (MATEIS)

Réparation Tissulaire, Interactions Biologiques et Biomatériaux (RTI2B, UPSP 2007-135-03)

Directeur de thèse:

Pr. Jérôme Chevalier (MATEIS, INSA-Lyon)

Pr. Daniel Hartmann (RTI2B, Claude Bernard Lyon I)

Président de jury : Frédéric Farizon

Composition du jury :

Didier Bernache ; Jean-Marc Chenal ; Jérôme Chevalier ; Frédéric Farizon ; Daniel Hartmann ; Sylvain Meille ; Elodie Pacard ; Hervé Petite ; Eduardo Saiz.